



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANALÝZA BIOTICKÝCH MATRIC METODOU
SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU**

ANALYSIS OF BIOTIC MATRICES BY LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Sára Střítežská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1363/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Sára Střítežská**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Analýza biotických matric metodou Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Zadání bakalářské práce:

V teoretické části bude sepsána literární rešerše zabývající se laserovou ablací vzorku, instrumentací, zpracováním dat a především možnostmi analýzy biotických vzorků, a to jak rostlinných, tak i měkkých a tvrdých tkání savců.

V experimentální části bude provedena série LIBS experimentů vedoucích k sestavení 2D map prvkového rozložení vybraných kontaminantů v tkáních modelových organismů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Sára Střítežská
student(ka)

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá možností využití metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS), v oblasti biologických aplikací. Metodou LIBS byla stanovena prostorová distribuce vybraného prvku, kadmia, ve zvoleném modelovém organismu, hořčici seté (*Sinapis Alba* L.). Expozice rostlin probíhala v hydroponických podmínkách po dobu 72 hodin, jednalo se tedy o akutní test toxicity. Testovány byly tři různé zdroje kadmia, kvantové tečky stabilizované kyselinou merkaptopropionovou (CdTe QDs), silanizované kvantové tečky, tedy s vnějším obalem oxidu křemičitého (CdTe/SiO₂ QDs), a jako pozitivní kontrola byl použit chlorid kademnatý. Po ukončení expozice rostlin a před samotným stanovením prostorové distribuce kadmia v rostlinách, byla velká část práce věnována optimalizaci vybraných parametrů LIBS měření (např. energie laseru a čas měření po laserovém pulzu). Následně bylo stanoveno prostorové rozložení kadmia a získané výsledky byly diskutovány s ohledem na testovanou látku, její stabilitu či tendenci k agregaci/aglomeraci ve vodném médiu při kontaktu s testovacím organismem v průběhu expozice. Závěrem práce byla také zhodnocena vhodnost metody LIBS pro stanovení prostorové distribuce vybraných kontaminantů v rostlinách.

ABSTRACT

This bachelor thesis discusses the possibility of using Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for biological application. The LIBS method was used to determine spatial distribution of a chosen element, cadmium, in selected model plant, white mustard (*Sinapis Alba* L.) The exposure took place in hydroponic conditions and lasted for 72 hours, therefore it was an acute toxicity test. Three different sources of cadmium were tested, mercaptopropionic acid stabilized quantum dots (CdTe QDs), silica coated quantum dots (CdTe/SiO₂ QDs), and cadmium chloride, which was used as a positive control. After the exposure and before determination of the spatial distribution of cadmium in plants, a significant portion of the thesis was devoted to optimization of selected parameters of LIBS measurement (laser energy and gate delay). Subsequently, the cadmium distribution was determined and the obtained results were discussed with regards to the tested substance, its stability and its tendency to aggregate/agglomerate in water medium in contact with testing organism during exposure. In the final part of the work, the suitability of the LIBS method for the determination of spatial distribution of chosen contaminants was evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

kadmium, kvantové tečky, prostorová distribuce, *Sinapis Alba* L., spektroskopie laserem buzeného plazmatu

KEYWORDS

cadmium, quantum dots, spatial distribution, *Sinapis Alba* L, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy

STŘÍTEŽSKÁ, Sára. Analýza biotických matric metodou Spektroskopie laserem buzeného plazmatu. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/114496>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí Ing. Pavlíně Modlitbové, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a čas, který mi věnovala. Dále děkuji Ing. Davidu Procházkovi, Ph.D. za věcné připomínky k mé práci, RNDr. Marii Kummerové, CSc. a RNDr. Štěpánu Zezulkoví, Ph.D. za poskytnutí prostor pro syntézu rostlin a Ing. Karlu Klepárníkovi, CSc. za poskytnutí prostor pro syntézu kvantových teček. V neposlední řadě děkuji své rodině za neutuchající trpělivost a podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu	8
2.1.1	Princip metody	9
2.1.2	Princip laseru	10
2.1.3	Ablace vzorku	10
2.1.4	Instrumentace	13
2.1.5	Emisní spektra	17
2.1.6	Vyhodnocení dat	18
2.1.7	Výhody a nevýhody metody LIBS	18
2.1.8	Využití metody LIBS	19
2.1.9	Způsoby přípravy rostlinných vzorků pro LIBS	19
2.2	Nanočástice	21
2.2.1	Nanotechnologie	21
2.2.2	Nanomateriály	21
2.2.3	Druhy nanočástic	21
2.2.4	Kvantové tečky	22
2.3	Ekotoxikologie	24
2.3.1	Ekotoxicita	25
2.3.2	Biotesty	25
2.3.3	Toxicita a bioakumulace kadmia v rostlinách	26
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Použité chemikálie	32
4.2	Použité přístroje a software	32
4.2.1	Přístroje	32
4.2.2	Software	32
4.3	Syntéza a silanizace kvantových teček	32
4.4	Test toxicity	33
4.5	LIBS experimenty	36
4.5.1	Optimalizace parametrů měření	36

	4.5.2 Měření rostlin <i>S. Alba</i>	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
	5.1 Vlastnosti testovaných látek	38
	5.2 Test toxicity se <i>S. alba</i>	39
	5.3 LIBS analýza	39
	5.3.1 Optimalizace parametrů měření	39
	5.3.2 Distribuce kadmia v rostlinách	42
6	ZÁVĚR.....	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58

1 ÚVOD

V současnosti zažívá lidstvo zatím nejrychlejší pokrok v oblasti vědy i techniky za celou svou historii. Ačkoli přicházející inovace přináší mnohá pozitiva, vznikají s nimi současně i četné problémy. Vhodným příkladem tohoto paradoxu jsou nanočástice vyráběné řízenou lidskou činností. S rychlým technologickým rozvojem nachází nanočástice uplatnění téměř ve všech oblastech lidské činnosti. Různé druhy nanočástic se využívají například v průmyslu, medicíně nebo potravinářství a jsou dnes již prakticky nepostradatelné. Narůstající použití nanočástic má však za následek jejich nevyhnutelný průnik do životního prostředí, kde ovšem některé z nich mohou negativně působit na jednotlivé složky ekosystému, a potažmo mohou kontaminovat i rozličné organismy [1].

Jedním z druhů nanočástic, které mohou představovat riziko pro životní prostředí, jsou kvantové tečky (QDs, z anglického *Quantum Dots*). Jedná se o polovodičové nanokrystaly (např. CdTe, CdSe, CdS [2]) s unikátními optickými vlastnostmi, především se schopností výjimečně stabilní a jasné fluorescence, které jsou využívány napříč mnoha obory, např. v elektronice, solárních článcích či při biologickém zobrazování [3]. Jejich široké uplatnění je však v současné době limitováno již zdokumentovaným uvolňováním iontů kadmia z jejich krystalové mřížky [2]. Tomu se dá zabránit přidáním vnějšího stabilního obalu (např. ZnS, SiO₂, ZnSe nebo CdS), který ionty kadmia v jádře uzavře a omezí nebo zcela zabráni jejich uvolňování do vnějšího prostředí [2]. Dále tyto obaly nabízí další výhody, jako jsou zvýšení biokompatibility nanočástic, efektivity fluorescence, chemické stability a snížení toxicity [4].

S rozšiřováním oblastí využití QDs napříč mnoha obory roste i možnost jejich uvolnění do životního prostředí a následné kontaminace organismů na všech trofických úrovních. Tato práce se věnuje modelovým organismům z řad producentů, jako vhodná rostlina pro tuto práci byla vybrána hořčice setá (*Sinapis Alba* L.). Jedná se o typického zástupce zemědělských plodin, velice často používaného v testech toxicity. Aby bylo možno vyhodnotit příjem, translokaci a bioakumulaci QDs ve vybrané rostlině, je nutné získat informace o jejich prostorovém rozložení. K tomuto účelu lze využít několik analytických technik (např. transmisní elektronová mikroskopie, rastrovací elektronová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a další) z nichž mnohé jsou velmi finančně a časově náročné, nelze je použít k analýze vzorků o velikostech v řádech centimetrů čtverečních či k analýze velkého množství vzorků [5]. Jako vhodná alternativa se proto nabízí využití metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS, z anglického *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*).

Metoda LIBS patří mezi optické emisní metody. Při dopadu vysokoenergetického laseru na povrch vzorku dojde k atomizaci látky a vygenerování plazmatu, které po dobu svého života emituje elektromagnetické záření, jež je následně detekováno optickým systémem.

Tato bakalářská práce je zaměřena na zhodnocení toxicity, a především distribuce dvou druhů QDs (CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs) a pozitivní kontroly chloridu kademnatého v modelové rostlině hořčice seté (*Sinapis Alba* L.). Prostorová distribuce kadmia v testovacích organismech byla stanovena metodou LIBS s prostorovým rozlišením 100 µm.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu je analytická metoda spadající mezi optické emisní metody (OES, z anglického *Optical Emission Spectroscopy*). Analytem je sledovaná látka (sloučenina či prvek, v případě této práce se jedná o kadmium) a matrice je prostředí, v němž se daný analyt stanovuje (zde biologický vzorek, rostlina *Sinapis Alba* L.). Hlavním účelem metody LIBS je určení složení dané matrice, jedná se o prvkovou analýzu [6]. Metoda byla dříve označována zkratkou LIPS (z anglického *Laser-Induced Plasma Spectroscopy*) pro zdůraznění vlivu vznikajícího plazmatu. Tento název byl nahrazen současným LIBS kladoucím důraz na průraz atmosféry při interakci laserového paprsku se vzorkem [7].

Metoda LIBS je založena na principu laserové ablace, což je souhrnný název pro děje, které nastanou při dopadu vysokoenergetického laserového paprsku na povrch vzorku. Během laserové ablace dochází k vytvoření laserem generovaného plazmatu. Laserový pulz dopadající na vzorek zde slouží jako zdroj pro následnou vaporizaci, atomizaci a excitaci ablatované hmoty. Na rozdíl od ostatních optických emisních či absorpčních spektroskopických metod umožňuje LIBS analyzovat hmotu ve všech třech skupenstvích, což je dáno právě faktem, že metoda je založena na laserové ablaci, kterou je možno provést na jakémkoli vzorku [6].

Tento způsob atomizace a vaporizace vzorku je u optických emisních a atomových absorpčních (AAS, z anglického *Atomic Absorption Spectroscopy*) metod poměrně neobvyklý. Obvykleji využívanými iniciátory atomizace pro optické metody jsou například plamen (plamenová AAS), vyhřívaná grafitová kyveta (elektrotermická AAS), indukčně vázané plazma (optická emisní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu ICP-OES, z anglického *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*), dále také jiskrový a obloukový výboj. Další technika, která využívá laserovou ablaci vzorku, je LA-ICP-MS/OES (laserová ablace se hmotnostní/optickou emisní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu, z anglického *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy/Optical Emission Spectroscopy*), která spojuje výhody laserové ablace a hmotnostní nebo optické emisní spektrometrie [8].

Jako kterákoli jiná OES metoda postupuje i LIBS v několika základních krocích: vaporizace a rozštěpení látky na jednotlivé atomy, excitace, detekce emitovaného elektromagnetického záření, kalibrace intenzity signálu např. ke koncentraci, a samotné určení koncentrace. LIBS se využívá jako kvalitativní i kvantitativní analýza, kdy je složení látky charakterizováno polohou píku ve spektru (tedy jeho vlnovou délkou), intenzita tohoto píku pak určuje koncentraci dané látky ve vzorku [6].

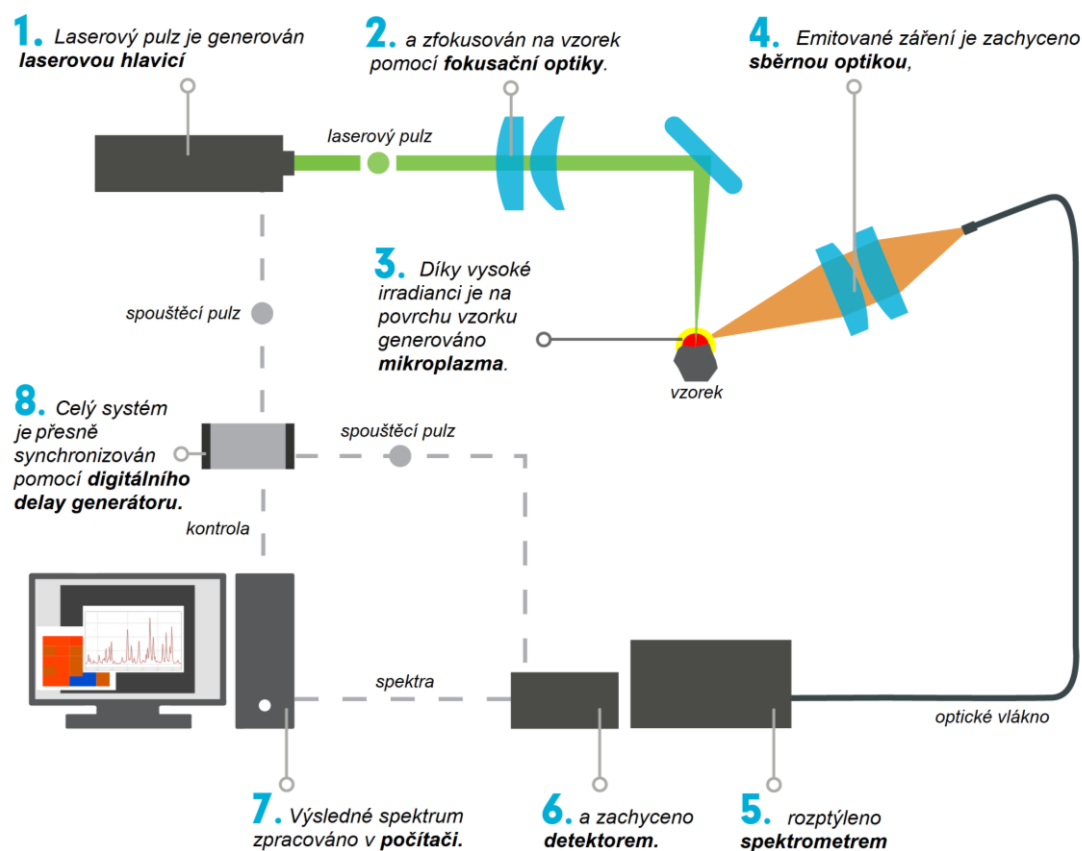
Historie spektroskopie laserem buzeného plazmatu se píše již od objevu laseru, který, ačkoli byl teoreticky předpovězen Albertem Einsteinem již roku 1917, byl zkonstruován až v roce 1960 [9]. Za zakladatele metody LIBS je považován původem italský profesor Nicoló Omenetto, který se během své kariéry zasloužil o významný rozvoj metody LIBS, přispěl jak k objasnění samotného principu metody, tak k nalezení mnohých praktických aplikací [10]. V počátcích existence metody byla pozornost vědců soustředěna především na

fyzikální stránku věci, především na generované plazma, jeho vznik a vlastnosti; jako analytická metoda se LIBS začal používat až později [6].

Ačkoli už v průběhu minulého století byla metodě LIBS věnována určitá pozornost, skutečný nárůst popularity této metody nastal až okolo roku 1995. Tohle prudké zvýšení zájmu o LIBS a jeho využití se dá připsat hned několika faktorům: vyskytla se nutnost zkoumat materiály v extrémních podmínkách, kde bylo nemožné využít jiné analytické metody; bylo potřeba sledovat kvalitu a složení průmyslových materiálů přímo při jejich výrobě a v neposlední řadě bylo širší využití metody LIBS umožněno velkým technologickým pokrokem. Toho se podařilo docílit mezi lety 1990 až 1995, a to především v oblasti zmenšení potřebných zařízení, jako jsou lasery, spektrometry a detektory, a současně navýšení jejich kapacity, což umožnilo i rozšíření mimolaboratorního použití [6].

2.1.1 Princip metody

Prvním krokem při analýze metodou LIBS je vznik vysokoenergetického laserového pulzu, který je fokusační optikou přesně zaměřen na konkrétní místo na povrchu vzorku. Při dopadu laserového paprsku na vzorek dojde k jeho prudkému ohřevu následovanému vypařením části hmoty, kdy se zkoumaný materiál uvolní v podobě par a aerosolů. Při další interakci vzorku s laserem vzniká plazmatický útvar, který po dobu své existence emituje elektromagnetické záření. To je následně sběrnou optikou zachyceno a optickým vláknem vedeno do spektrometru, kde je rozděleno dle jednotlivých vlnových délek, a zachyceno detektorem. Schéma tohoto procesu je znázorněno na Obrázku 1 [6, 7, 11].

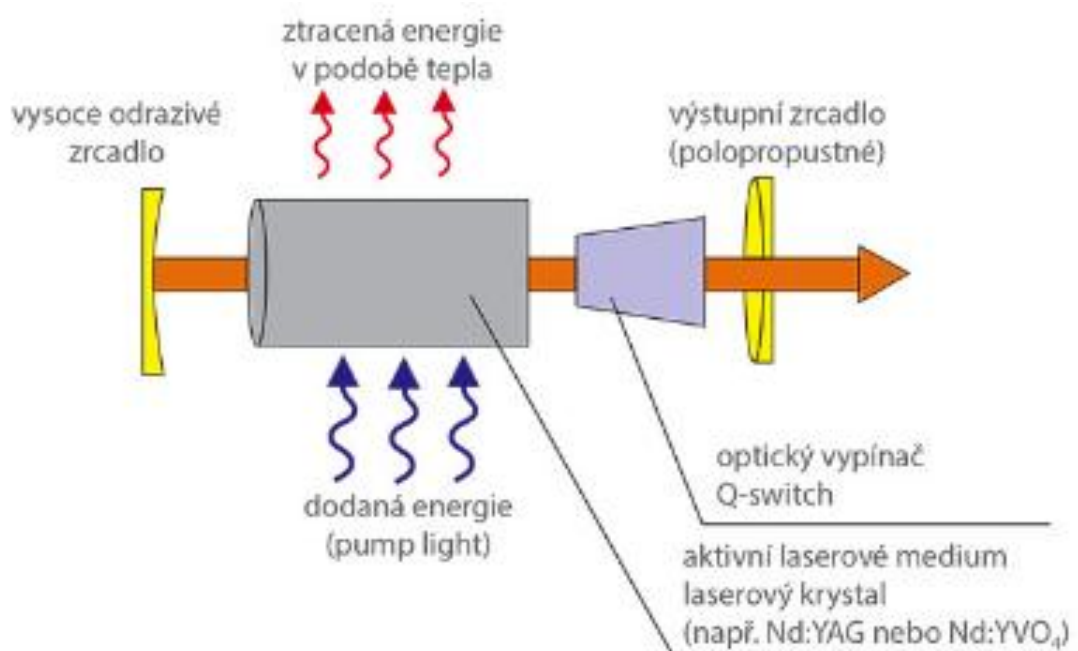


Obrázek 1: Schéma LIBS měření [11]

2.1.2 Princip laseru

Lasery jsou zdrojem monochromatického a koherentního elektromagnetického záření. Laserový paprsek je tvořen organizovaným svazkem fotonů o stejné amplitudě, fázi a polarizaci, na rozdíl od běžného viditelného světla, v němž se fotony chovají neuspořádaně [12, 13].

Princip laseru, jehož stavba je vyobrazena v Obrázku 2, je založen na excitaci elektronů různých aktivních prostředí (pevných, kapalných či plyných materiálů) v polopropustném rezonátoru tvořeném jedním dokonalým a jedním polopropustným zrcadlem. Excitace je možno dosáhnout předáním energie materiálu, čehož lze docílit více způsoby: elektricky – za použití elektrického výboje, chemicky – exotermickou chemickou reakcí (např. disociací molekul jodu nebo reakcí vodíku s fluorem) nebo opticky – světelným zábleskem. Při opětovném přechodu elektronu na nižší energetickou hladinu dojde k vyzáření charakteristického fotonu, počet těchto fotonů v aktivním prostředí exponenciálně roste. Fotony se shromažďují mezi dvěma zrcadly, při dosažení mezní hranice energie polopropustné zrcadlo svazek fotonů vyzáří jako laserový paprsek nebo pulz [12].



Obrázek 2: Schéma fungování pevnolátkového laseru [14]

2.1.3 Ablace vzorku

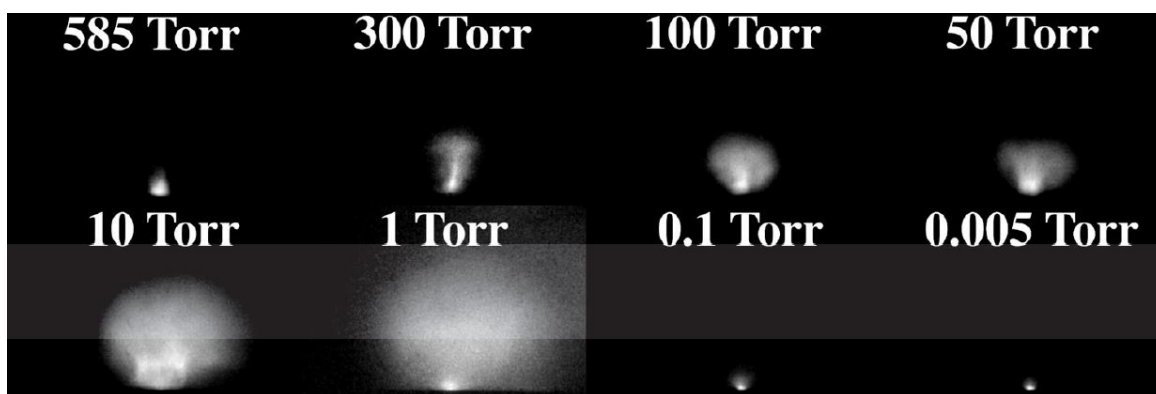
Ablace se využívá k převodu materiálu odpařeného ze vzorku, dočasně přítomného v podobě par a aerosolů, do excitačního a ionizačního prostředí [7]. Jedná se o vzorkovací proces metody LIBS pro pevné a kapalně vzorky, protože limituje množství analytu, které bude v rámci jednoho měření analyzováno. Ablatovaný materiál hraje významnou roli ve formaci a expanzi plazmatu. Plazma vzniká v prostoru obklopeném plynným médiem a jediným způsobem, jakým je možno plazma udržet, je přítomnost neutrálních atomů a iontů z ablatovaného materiálu [9].

Při přípravě vzorků pro kteroukoli analytickou metodu platí, že by měl vzorek rovnoměrně reprezentovat zkoumaný materiál, ať už se jedná o makro či mikro analýzu. Nejinak je tomu

u metody LIBS, z čehož plyne, že ablace nesmí pozměnit složení ablatovaného materiálu vůči původnímu vzorku. Tento problém je možno vyřešit vhodnou kalibrací a korelací vhodných referenčních standardů, které odpovídají testované matici [9].

Samotný proces ablace je ovlivněn instrumentálními parametry, jako je vlnová délka laseru, plošná hustota zářivého toku (irradiance) nebo doba trvání laserového pulzu, přičemž se nejčastěji užívá ablace femtosekundovými a nanosekundovými lasery. Ačkoli femtosekundové lasery mají tu výhodu, že laserový pulz nereaguje se vznikajícím plazmatem, nanosekundové lasery jsou mnohonásobně rozšířenější, jelikož, oproti femtosekundovým laserům, znatelně navyšují intenzitu spektra [9, 15].

Na průběh ablace mají rovněž vliv vlastnosti analyzované matrice, především její skupenství, tepelná vodivost, reflektivita povrchu či bod tání a varu. V neposlední řadě ablaci ovlivňuje okolní atmosféra a její tlak (pro některé speciální aplikace se používá i vakuum), jak je patrné z Obrázku 3. Experiment samotný je nejčastěji realizován na vzduchu, popřípadě v atmosféře argonu či helia. Některé experimenty dokázaly, že argonová atmosféra zlepšuje excitaci vybraného vzorku [6] a naopak atmosféra vzduchu či helia ji tlumí [6, 9].



Obrázek 3: Závislost vývoje plazmatu na okolním tlaku [6]

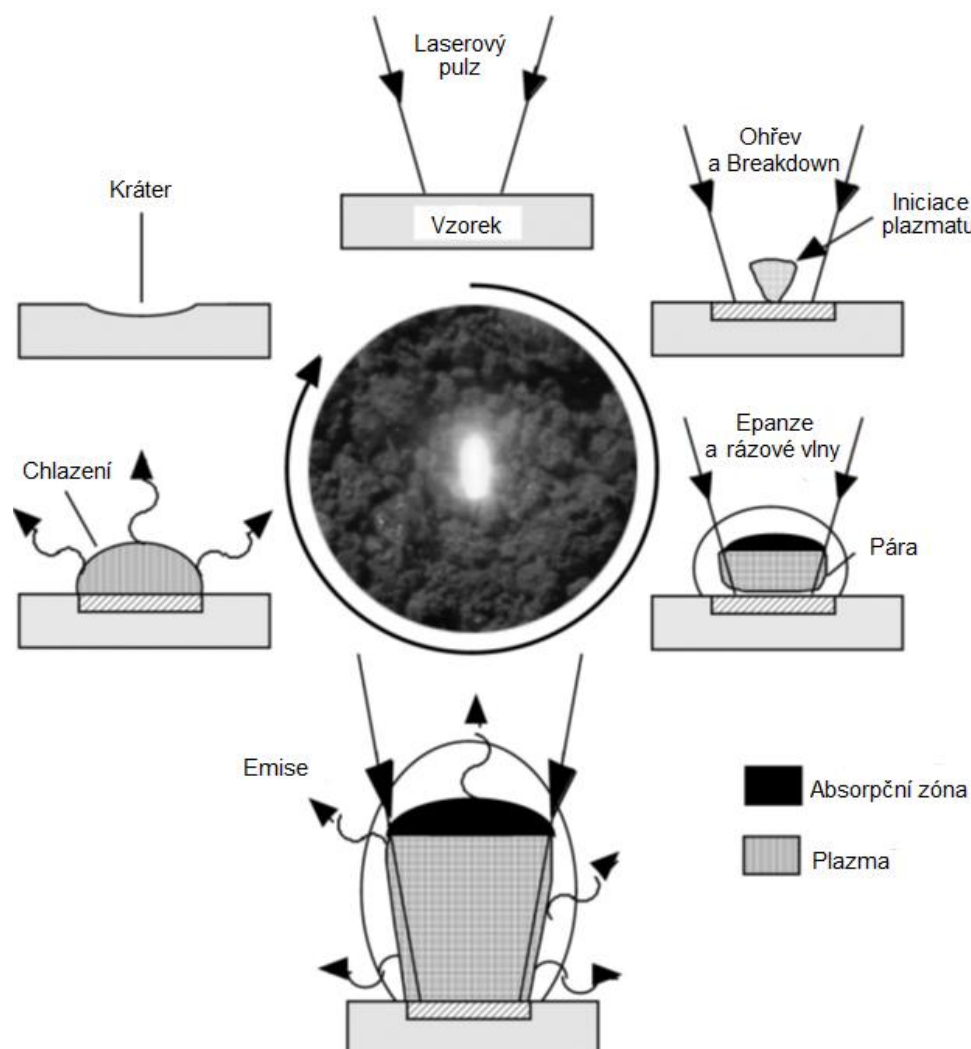
Základem pro určení prvkového složení sledované matrice je u metody LIBS elektromagnetické záření emitované vzniklým plazmatem. Aby plazma vzniklo a mohlo být dočasně udrženo, je třeba zaručit jistý přísun energie, která slouží k zahřátí a následnému vyrovnání tepelných ztrát způsobených jeho vyzařováním a vedením. V metodě LIBS je toho dosaženo velkou plošnou hustotou výkonu, kterou zajišťuje laserový pulz [7].

Vznik plazmatu a jeho časový vývoj

Interakce fotonů a elektronů iniciuje děje označované jako multifotonové procesy vedoucí k lavinové ionizaci. Elektrony získávají energii ve trojných srážkách s fotony a neutrály, vlivem velkého množství srážek roste jejich energie a nejsou tedy schopny ionizovat další atomy. Výskyt zmíněných jevů je navyšován až do chvíle, kdy dojde k průrazu atmosféry (*breakdown*), což je okamžik, který nastává často v průběhu dopadu laserového pulsu a plazma je během něj viditelné. Tato viditelná část záření není sbírána, protože obsahuje vysoké pozadí, a nemá proto žádnou analytickou hodnotu. Stupeň ionizace je v tuto chvíli nižší než 10 % [7].

V průběhu trvání laserového pulzu dochází k dalšímu nárůstu elektronové hustoty. Jakmile je frekvence plazmatu vyšší než frekvence laseru, stane se pro něj plazma neviditelným a laser nepředává energii do celého jeho objemu, ale pouze vnější vrstvě plazmatu. Čím blíže je

plazma laseru, tím více se rozšiřuje. Ablace samotného vzorku je nadále zprostředkována laserovým mikrop plazmatem, které se rozvíjí ještě několik nanosekund po vyhasnutí laseru. Proces vzniku a zániku plazmatu není přesně časově ohraničen, celý jeho životní cyklus je znázorněn na Obrázku 4 [7].



Obrázek 4: Životní cyklus plazmatu a děje, které ho provázejí [6]

Rozpínání plazmatu proti okolní atmosféře způsobí stlačení hraniční vrstvy do rázové vlny, což se projeví snadno slyšitelným prasknutím. Rychlost rozpínání plazmatu těsně po jeho vzniku je až $10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, viditelná oblast dosahuje velikosti několik milimetrů a je pozorovatelná pouhým okem. V plazmatu se jako první objevují iontové čáry (v čase $10^{-1} \mu\text{s}$), následované atomovými čarami (10^0 – $10^1 \mu\text{s}$). Po poklesu teploty plazmatu, o několik desítek mikrosekund později, se jako poslední objevují i molekulové pásy, které ovšem v metodě LIBS nenachází uplatnění, nezaznamenávají se a je snaha je eliminovat [7].

Při průchodu fotonů vnějšími chladnějšími částmi plazmatu dochází k častým samoabsorpčním, což je proces, při němž atomy ve vnější, chladnější části plazmatu absorbují fotony emitované týmiž atomy v jeho centru. Ve spektru se samoabsorpce projeví jako snížení intenzity čáry v jejím středu tak, že po bocích bude její intenzita vyšší a uprostřed vznikne prohlubeň [7, 16]. Z toho plyne, že základní rezonanční čáry, což jsou čáry vznikající nejpravděpodobnějším přechodem mezi základním a nejbližším excitovaným stavem a jsou

pro dané prvky nejcitlivější, jsou pro účely kvantitativní analýzy nevhodné, protože podléhají samoabsorpci [7, 17].

2.1.4 Instrumentace

Instrumentace každého laserového spektrometru se skládá z několika stejných základních částí. Součástí aparatury musí být laser, který umožňuje laserovou ablaci vzorku, dále fokusační optika pro zaostření laserového paprsku a sběrná optika pro emitované elektromagnetické záření. Vzorek se umísťuje buď do ablační komory, nebo se užívá otevřeného klecového systému. Při použití klecového systému však není možno měnit tlak ani složení atmosféry, ve které probíhá ablace. Elektromagnetické záření je nadále zpracováno detekčním systémem a informace putuje do programu pro zpracování získaných emisních spekter, přičemž se dá využít řada specializovaných programů (např. AtomAnalyzer), nebo data zpracovat pomocí standardních statistických nástrojů [18]. Jelikož je základní sestava LIBS aparatury poměrně jednoduchá, je možné pro různé speciální aplikace systém snadno modifikovat, aby lépe plnil požadovaný konkrétní účel. K takovýmto úpravám se využívají jednodušší experimentální laboratorní aparatury, u zakoupených komerčních prototypů tyto typy úprav nelze uskutečnit [6].

Lasery

Laser pro použití v metodě LIBS musí mít dostatečnou energii pro vytvoření plazmatu [18]. Mezi parametry nutné pro výběr vhodného laseru patří zejména energie laserového pulsu a frekvence jeho opakování, kvalita vyzářeného laserového paprsku, jeho vlnová délka. Z praktických a ekonomických parametrů se jedná o jeho velikost, hmotnost a energetické náklady na provoz a chlazení [6]. Vlnová délka laseru, tedy energie jeho fotonů, má velký vliv na proces ablace. Obecně platí, že čím je vlnová délka laseru kratší, tím je ablace účinnější [19].

Pro různé aplikace jsou vhodné různé vlnové délky laserů, například je-li cílem dosažení velkého rozlišení při mapování, je výhodné použít laser 532 nm, protože s ním, oproti laseru o vlnové délce 1 064 nm, lze dosáhnout lepšího zaostření, a tím i menších kráterů, přičemž rozlišení výsledného obrazu je limitováno, kromě technických možností stroje, pouze velikostí vznikajících kráterů [20].

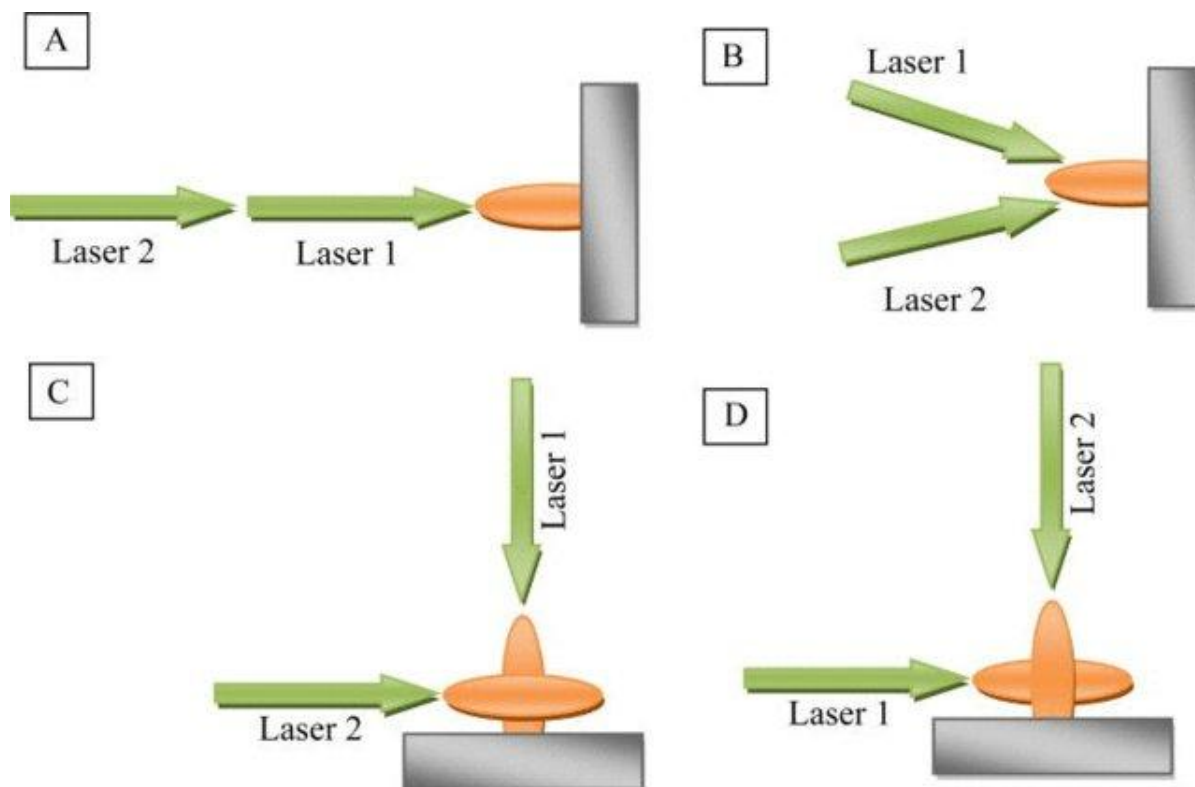
Druhy laserů pro LIBS

Pro LIBS se obvykle používají pevnolátkové lasery, nejčastěji takové, kde se k excitaci aktivního prostředí používá výbojka (flashlamp) a k propuštění laserového paprsku Q-switch, díky němuž jsou získávány silné a krátké (6–15 ns) laserové pulzy, typický průměr laserového paprsku je 5 mm [7, 21]. V dnešní době se obvykle používají Nd:YAG lasery (Yttrium Aluminium Granát $Y_3Al_5O_{12}$ dopovaný ionty neodymu [14]), se základní vlnovou délkou 1 064 nm. Za použití generátorů vyšších harmonických frekvencí se dá snadno dosáhnout i záření o kratších vlnových délkách. Druhá harmonická frekvence s 532 nm se nachází v oblasti viditelného světla, třetí (355 nm), čtvrtá (266 nm) a pátá (213 nm) harmonická frekvence pak spadají do oblasti ultrafialového záření [7]. Výhoda laserů tohoto typu je, že se dají použít i v přenosných zařízeních, protože, na rozdíl od laserů vyžadujících intenzivní vodní chlazení, je pro ně dostačující chlazení vzduchem [6, 7].

Jako další se využívá rubínový laser s vlnovou délkou 694 nm, z plynových laserů pak CO₂ (1 060 nm) a N₂ (337 nm). Pro všechny výše uvedené typy platí, že v řádu několika nanosekund vyprodukují desítky miliJoulů. Laserový paprsek je přitom zaostřen (fokusován) na velmi malou plochu vzorku, obvykle se jedná o oblast o velikosti několika málo desítek čtverečních mikrometrů, z čehož plyne vysoká plošná hustota výkonu (*irradiance*), která umožňuje vytvoření a udržení plazmatu, rozbití vazeb mezi atomy v pevných a kapalných látkách. V plynném skupenství dochází k optickému průrazu (*breakdown*). Lasery běžně používané pro LIBS mají obvykle frekvenci mezi 10 až 50 Hz, v současnosti je nejvyšší dosažená frekvence měření až 1 000 Hz [18, 22].

Dvoupulzní technika LIBS

Pro zlepšení výkonu měřicí aparatury je možno použít tzv. dvoupulzní techniku LIBS (*double-puls LIBS*), při níž se používají dva časově posunuté laserové paprsky. Dvoupulzní technika LIBS poskytuje několik možností, které jsou vizualizovány na Obrázku 5: ortogonální uspořádání (jeden paprsek směřuje kolmo do povrchu vzorku a druhý s ním svírá úhel 90° a je veden těsně nad povrchem vzorku), kolineární uspořádání (oba dva paprsky jsou vedeny ve směru kolmém na vzorek) nebo uspořádání s křížením laserových paprsků pod definovaným úhlem, kdy paprsky dopadají na povrch vzorku současně. Užití dvou časově posunutých laserových paprsků zvyšuje citlivost měření, je dosaženo vyšší intenzity spektrálních čar a současně nižšího pozadí, díky několika probíhajícím efektům: reexcitaci, větší ablaci vzorku, zvýšení teploty plazmatu a prodloužení doby jeho existence [7, 23, 24].



Obrázek 5: Uspořádání laseru pro double-puls LIBS. (a) kolineární konfigurace, (b) konfigurace s křížením laserových paprsků, (c) ortogonální konfigurace s opětovným ohřevem plazmatu, (d) ortogonální preablační konfigurace [24]

Ablační komora

Ablační komora slouží k přesnému nastavení a následné kontrole podmínek průběhu experimentu. Ačkoli měření metodou LIBS se může uskutečnit za atmosférických podmínek, hojně se využívá analýza vzorku v různých atmosférách (argon, helium), při přetlaku, podtlaku či ve vakuu. Aby nedocházelo ke kontaminaci povrchu vzorku prachem nebo již odablatovanými částmi materiálu, využívá se ofuk a odtah. Všechny tyto alternace měřicích podmínek si kladou za cíl snížení limitu detekce sledovaného analytu. Požadavky na ablační komoru jsou především vzduchotěsnost, napojení na vzduchotechniku a její snadná kontrola, umožňující výše uvedené operace, a reprodukovatelné umístění vzorku v držáku. Pro možnost mapování a 2D analýzy vzorků jsou ablační komory vybaveny pohyblivým stolcem. Ablační komory mohou být sestaveny z křemenného skla nebo nerezové oceli. Na ablační komoru jsou napojeny všechny externí přístroje: spektrometry a lasery [18].

Optické komponenty

Optická vlákna mají za úkol transportovat laserový paprsek ke vzorku a dovést získané elektromagnetické záření ke vstupní štěrbině spektrometru pro další zpracování. Laserový pulz před dopadem na vzorek prochází soustavou čoček, kterými je zaměřen na povrch vzorku. V nejjednodušších sestavách je pro zaměření pulzu použita jen jediná jednoduchá čočka, sofistikovanější zařízení využívají řady objektivů s možnostmi určení průměru ozařované plochy nebo homogenizace laserového paprsku. Je možno využít jedno optické vlákno pro laserový paprsek i emitované záření, čehož se využívá především ve speciálních aplikacích v přenosných sestavách, nebo lze použít dvě samostatná vlákna [7, 18].

Při sběru prochází elektromagnetické záření nejčastěji jednoduchou čočkou nebo kombinací zrcadla s otvorem a jednoduché čočky do optického vlákna, které jej vede dále do spektrometru. Elektromagnetické záření se odráží pod úhlem 45 stupňů na čočku, která jej zaostří na vstup do optického vlákna. Optické vlákno je na počátku vybaveno objektivem pro účinné sbírání elektromagnetického záření, samotné vlákno je složeno z několika dalších samostatných optických vláken, která jsou na konci oddělena a jednotlivě zavedena do spektrometru [7, 18].

Detektory

Detektory pro LIBS musí splňovat několik základních podmínek: musí být schopny rychlého zapnutí a vypnutí, musí být dostatečně citlivé a synchronizovatelné s laserovými pulzy [7]. Nejjednodušší detektory pro LIBS jsou fotonásobiče (PMT, z anglického *Photomultipliers*) a fotodiody (PD, z anglického *Photodiodes*), které jsou vyrobeny z materiálu citlivého na dopadající světlo, jenž generuje signál proporcionální k celkovému dopadajícímu světlu. Tato zařízení se používají společně s monochromátory a fixními filtry [18].

Nověji se používaly detektory získané umístěním malých fotosensitivních elementů (pixelů) do lineárního nebo dvoudimenzionálního uspořádání, které obsahují prostorovou informaci o signálu díky světelnému vzoru zobrazenému na pixelovém poli. Na tomto principu fungují detektory diodového pole (PDA, z anglického *Photodiode Arrays*) nebo zařízení s vázanými náboji (CCD, z anglického *Charged Coupled Devices*). Rozdíl mezi PMT/PD detektory a PDA/CCD detektory je, že PMT/PD jsou vysokorychlostní detektory schopné zaznamenat změny v plazmatu v průběhu času, zatímco PDA/CCD jsou ve své

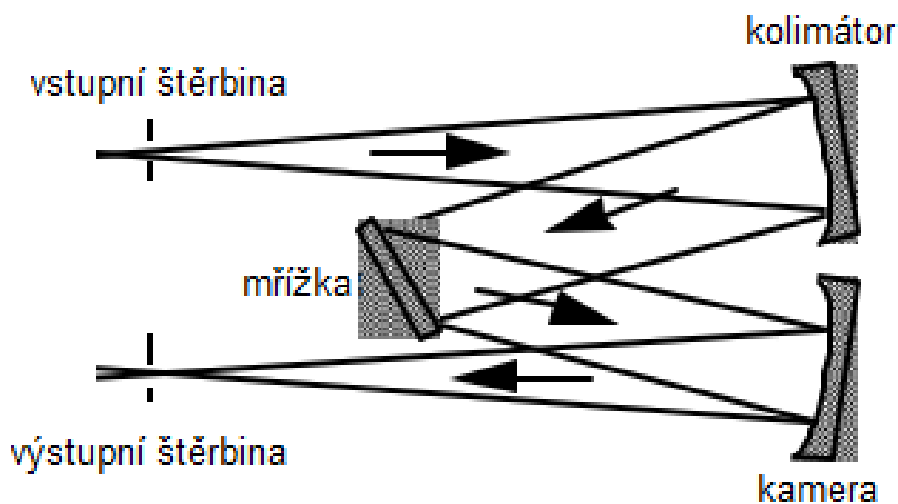
rychlosti limitovány, protože všechny pixely se načítají postupně. CCD však na rozdíl od PMT/PD/PDA poskytují výsledný signál ve dvou osách [6].

LIBS měření používají časovanou detekci plazmatu, kdy je nutno ze signálu odečíst bílé světlo vyskytující se na počátku existence plazmatu (0-1 μ s). Toho PDA/CCD docílí umístěním mikrokanałové desky (MCP, z anglického *Microchannel Plate*) před detektor, kde se MCP chová jako klapka, která zabraňuje světlu v dosažení detektoru za sebou [6].

V dnešní době se pro LIBS používají v podstatě výhradně polovodičové CCD detektory, které splňují všechna požadovaná kritéria až na dostatečnou citlivost. Tento problém je vyřešen použitím intenzifikátoru; intenzifikované detektory se potom označují jako ICCD (z anglického *Intensified CCD*). CCD detektory snímají celá spektra nebo jejich definované části, podle typu používaného spektrometru, v přesně definovaném čase po iniciaci laserového pulzu. Času měření po laserovém pulzu se anglicky říká *Gate Delay* (GD), obvykle se podle typu vzorku používá 0,5 až 2 μ s po dopadu laserového pulzu, ale je možné setkat se i s odlišnými hodnotami. Časový interval, během něž CCD detektory snímají signál, se nazývá integrační doba (GW, z anglického *Gate Width*), musí být rovněž přesně definován parametr a jeho velikost je maximálně v desítkách mikrosekund [7].

Spektrometry

Pro metodu LIBS se používají dva typy spektrometrů: monochromátory s uspořádáním Czerny-Turner a spektrometry s mřížkou typu Echelle. Monochromátory Czerny-Turner zaznamenávají informace vždy pouze o ohraničené části emisního spektra. Na vstupní štěrbině jsou selektovány vlnové délky spadající do snímané oblasti, následuje kolimátor (konkávní zrcadlo), které má za úkol sjednotit směr záření jednotlivých vlnových délek. Záření poté prochází difrakční mřížkou obsahující 1 200 až 3 600 štěrbin na milimetr, která záření rozdělí podle jednotlivých vlnových délek. Platí, že čím vyšší je hustota štěrbin na difrakční mřížce, tím je dosaženo lepšího rozlišení, čím je hustota nižší, tím projde více světla a jsou získány vyšší intenzity. Oddělené vlnové délky putují k druhému konkávnímu zrcadlu (kameře), která je fokusuje do výstupní štěrbině. Difrakční mřížka je schopna rotovat tak, že pod odlišným úhlem povede ke kameře záření různých vlnových délek. Jednotlivé vlnové délky jsou tedy sbírány individuálně, emisní spektrum je skenováno rotací difrakční mřížky. Schéma monochromátoru typu Czerny-Turner je uvedeno v Obrázku 6 [2, 25, 26].



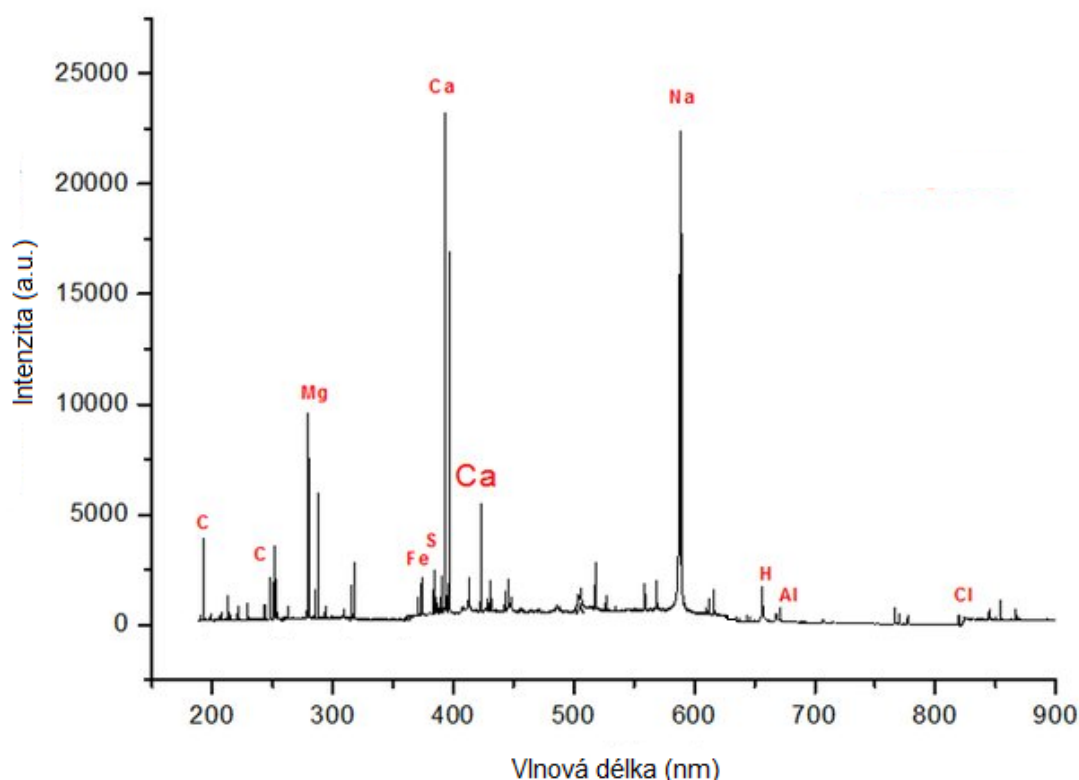
Obrázek 6: Monochromátor v uspořádání Czerny-Turner [27]

Naproti tomu spektrometry s mřížkou typu Echelle zaznamenávají celé spektrum, většinou v rozsahu od 190 nm do 800 nm, což je oblast, ve které měření LIBS probíhají nejčastěji, protože zde obvykle leží nejintenzivnější spektrální čáry většiny prvků, a umožňují tak současné sledování mnoha komponent. Difrakční mřížka rozdělí světlo podle vlnových délek a utvoří spektrograf, z něhož jsou patrné vlnové délky a jejich intenzity, přítomnost píku se projeví jako jasná tečka. Oba druhy spektrometrů se používají v kombinaci s výše zmíněnými polovodičovými ICCD detektory [6, 7].

Měření LIBS může probíhat v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) i infračervené (IR) oblasti. Z UV oblasti se pro LIBS využívají vlnové délky (200–400 nm) a typickým zástupcem je například uhlík, VIS oblast se používá v celém svém rozsahu (400–700 nm) s charakteristickými představiteli z oblasti kovů (železo), z IR oblasti se využívá pouze část blízkého infračerveného záření (700–900 nm), zástupce tvoří kupříkladu halogeny [28].

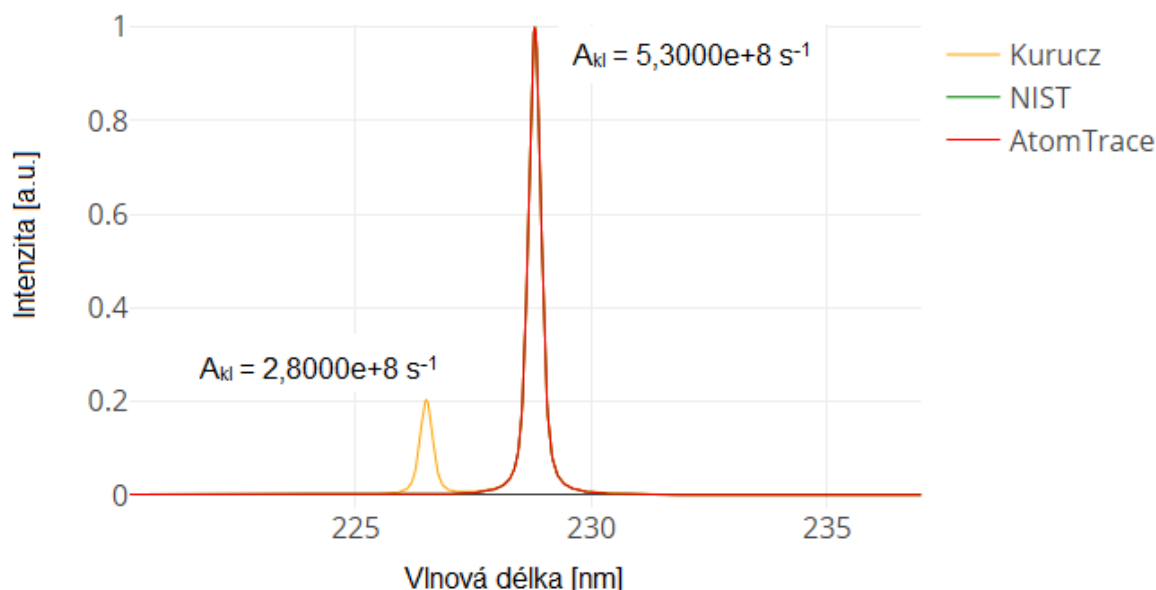
2.1.5 Emisní spektra

Výsledkem měření metodou LIBS je získané emisní spektrum. V něm jsou na ose *x* vyobrazeny vlnové délky (nm) a na ose *y* intenzita (a.u.) elektromagnetického záření, viz Obrázek 7.



Obrázek 7: Příklad emisního LIBS spektra vzorku bakterie *Escherichia coli* [29]

Existují online dostupné databáze (např. AtomTrace [28], NIST [30], Kurucz [31]), ve kterých jsou uvedeny tabelované hodnoty spektrálních čar pro jednotlivé prvky, spolu s pravděpodobností jejich výskytu vyjádřenou Einsteinovým koeficientem (A_{ki} (s^{-1}); je přímo úměrný pravděpodobnosti vzniku spektrální čáry a její intenzitě, viz Obrázek 8). Jednotlivé spektrální čáry jsou označeny římskými čísly I a II, římská I znamená, že se jedná o atomovou čáru, římská II značí čáru iontovou [28, 32].



Obrázek 8: Vyobrazení vlivu Einsteinova koeficientu na intenzitu signálu pro spektrální čáry kadmia: 226,50 nm (vlevo) a 228,80 nm (vpravo) [28]

2.1.6 Vyhodnocení dat

Vyhodnocení dat se dá rozdělit na kvalitativní a kvantitativní analýzu. Složení zkoumaného vzorku (kvalitativní analýza) se dá snadno určit z pozice spektrálních čar na emisním spektru a je omezena pouze citlivostí přístroje a limity detekce [33].

Kvantitativní analýza naproti tomu přináší celou řadu výzev. Aby bylo možné určit kvantitativní složení sledovaného vzorku, je třeba nejprve udělat vhodnou kalibraci. Kalibrační standardy obsahující sledovaný analyt se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi musí co nejvíce blížit testované matici, například při testování obsahu uhlíku v oceli se nejprve sestaví kalibrační křivka z certifikovaných vzorků oceli o známém obsahu uhlíku [34]. Při sestavování kalibrační křivky nesmí dojít ke změně podmínek měření [33].

Pro samotné vyhodnocení dat existuje více přístupů. Hodnota intenzity přímo souvisí s koncentrací prvku ve vzorku, kvůli interferenčním jevům se však nejedná o jednoduchou přímou úměru. Častý je postup, při němž se vybere vhodná spektrální čára sledovaného prvku (např. nesmí být rezonanční), zjistí se plocha pod vybraným píkem a následně se od ní odečte hodnota pozadí. Hodnoty zjištěné koncentrace jsou nejčastěji uváděny v jednotkách hmotnosti jako hmotnost analytu na hmotnost vzorku. Kvůli možné nehomogenitě vzorku a vyloučení chyby je měření nutno vícekrát opakovat [33].

2.1.7 Výhody a nevýhody metody LIBS

Metoda LIBS je v současnosti velice populární, nárůst zájmu v poslední době je výsledkem mnoha jeho výhod. Pomocí metody LIBS je možno analyzovat vzorky jakéhokoli skupenství. Mnohé aplikace metody LIBS nevyžadují žádnou přípravu vzorku, což může být u jiných analytických metod časově i finančně náročná záležitost. Materiály je tedy možné zkoumat *in situ* [18]. LIBS umožňuje sledování 2D i 3D distribuce analytu ve vzorku za použití mapování povrchu a hloubkového profilování [35]. Ačkoli LIBS vznikl především jako metoda terénní analýzy, díky pokroku v oblasti technologií nachází dnes široké uplatnění i v laboratorním použití [36]. Samotné měření je velice rychlé, ablace i excitace nastanou

v jednom společném kroku, výsledky je možné sledovat prakticky v reálném čase. Laserové spektrometry mohou dnes být díky pokročilým technologiím redukujících jejich velikost používány i v průmyslovém a venkovním prostředí, existují i přístroje pro dálkovou analýzu, kdy vzorek může být ve vzdálenosti několika desítek metrů od instrumentu. Pomocí metody LIBS je rovněž možné analyzovat extrémně tvrdé materiály nebo materiály, které je obtížné rozložit či rozpustit (např. keramika). Při měření se dá snadno pozorovat mnoho různých prvků současně (multiprvková analýza) [18].

Mezi nevýhody metody LIBS patří především její komplexnost, která vede ke složité kvantifikaci získaných dat, metoda se někdy uvádí jako semikvantitativní, kvantifikace je obtížná a možná jen při správné kalibraci. Při měření je třeba brát v potaz i velké interferenční efekty, především efekt matrice, v níž se daný prvek vyskytuje, její drsnost, tvrdost i obsah dalších prvků [18, 37]. V neposlední řadě je nutno brát zřetel i na množství přítomné vody, a to především v biologických vzorcích, její přítomnost ovlivňuje tepelné a optické vlastnosti matrice a tím i vznik plazmatu, jehož emise s přibývajícím množstvím vody ve vzorku klesá [38]. Proto je pro každé měření, které má vést k určení celkového množství prvku ve vzorku, nutno provést vhodnou kalibraci, ideálně na vhodných standardech, které často nejsou dostupné. Limity detekce metody LIBS obecně nejsou tak dobré jako u metod, které analyzují vzorek již převedený do vodného roztoku, dále se tato metoda vyznačuje i horší přesností (5 až 10 %, podle homogenity matrice vzorku a excitačních vlastností laseru). Pro některá specifická použití, například mapování tkání, je nutná velice náročná příprava vzorků. Dále práce s lasery může představovat zdravotní riziko, při nedodržení bezpečnosti práce hrozí poškození očí [18].

2.1.8 Využití metody LIBS

Metoda LIBS nachází široké využití v mnoha odvětvích lidské činnosti. Za pomoci metody LIBS lze v reálném čase analyzovat v podstatě bez přípravy vzorku nejrozličnější kovy, což je vlastnost nacházející uplatnění například při kontrole složení a homogenity výrobků ve výrobním procesu. LIBS umožňuje i hloubkové profilování vrstevnatých materiálů a analýzu tenkých vrstev v elektrotechnickém průmyslu. V oblasti ochrany životního prostředí je možné touto metodou detekovat přítomnost i rozložení esenciálních či neesenciálních prvků v rostlinách. V medicíně se metody LIBS využívá například k analýze žlučových kamenů nebo detekci zhoubné kožní tkáně [7, 39].

Přenosné LIBS systémy se uplatňují například v kriminologii k detekci chemických látek, nebo pro vojenské účely k detekci stopových množství výbušnin, chemických a biologických zbraní. Další zajímavou aplikací je využití metody LIBS na Marsu, konkrétně se jedná o zařízení ChemCam na vozítku Mars Curiosity, jehož úkolem je určování složení nerostů, hornin a půd, a to až na vzdálenost 7 metrů, a dále detekce prvků nezbytných pro existenci života jako jsou uhlík, dusík a kyslík [7, 39, 40].

2.1.9 Způsoby přípravy rostlinných vzorků pro LIBS

Pro analýzu rostlinného materiálu metodou LIBS je v literatuře uvedeno několik postupů, ty jsou detailněji popsány dále a jsou vždy voleny na základě požadovaných výsledků analýz [36].

Peletování

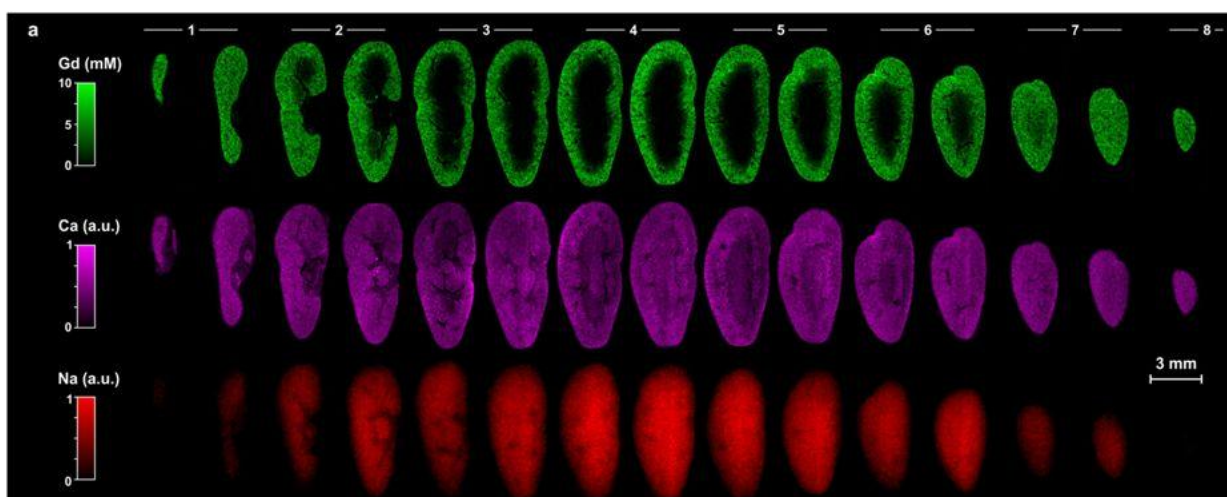
Je-li cílem zjistit pouze přítomnost či celkový obsah vybraného analytu, je vhodné využít peletování. Prvním krokem u tohoto postupu je vysušení rostliny, dále její rozemletí na jemný prášek následované homogenizací a slisováním do pelety. Na ní je následně možné provést až několik set jednotlivých měření. Některé vzorky však nevytvoří soudržnou peletu, a je proto nutné přidat pojidla (např.: bromid draselný, škrob, stříbro, hliník) [36, 41].

Fixace do epoxidové pryskyřice

Další možností přípravy rostlinných vzorků pro prvkovou analýzu metodou LIBS, obzvláště je-li cílem mapování biologického vzorku, a tedy zobrazení 2D distribuce sledovaných prvků, je jejich fixace epoxidovou pryskyřicí. Rostliny je nutné nejprve vysušit a vylisovat. Takto připravené rostliny se poté uchytí na povrch tuhnoucí epoxidové pryskyřice, která je dokonale zafixuje bez jakéhokoli pozměnění jejich struktury. Kalibrační měření musí být prováděna na matrici fixované ve stejné epoxidové pryskyřici [42, 43].

Zalévání vzorku do parafínu

Dalším způsobem přípravy vzorků je jejich zalití do parafínu, což je používáno pro přípravu řezů pro zobrazení 2D až 3D distribuce sledovaných prvků. Vzorky jsou nejprve dehydrovány sérií roztoků ethanolu o zvyšující se koncentraci, poté jsou zafixovány ve vosku a nařezány na různě tenké řezy, které jsou použity pro LIBS analýzu [42, 44]. Pro tvorbu těchto řezů se používá mikrotom, což je stroj sloužící k přípravě velmi tenkých řezů, obvykle pro mikroskopování histologických preparátů [45]. Výskyt vybraných prvků je následně korelován s histologickým řezem. 3D obraz je poté možno získat z měření po sobě jdoucích příčných či podélných řezů o šířce jednotek až nižších desítek mikrometrů, jednotlivá měření jsou poté zpracována a poskládána za sebe tak, aby utvořila původní vzorek (viz Obrázek 9). Tento přístup však generuje velká množství dat a je časově extrémně náročný, zatím je z literatury známa pouze 3D analýza distribuce vybraných prvků (Gd, Ca, Na) v myší ledvině [43]. U rostlin zatím není z literatury znám případ sestavení 2D map do 3D modelu pro žádný prvek [45].



Obrázek 9: Distribuce vápníku, sodíku a nanočástic gadolinia v řezech myší ledviny [43]

Zmrazení

Další možností přípravy vzorku za účelem stanovení 2D nebo 3D distribuce prvků je příprava kryořezů. Při ní jsou vzorky nejprve omyty a jsou ochráněny proti vzniku krystalů vody při zmrazení například použitím sacharóзовého roztoku. Poté dojde k samotnému zmrazení (teploty okolo -20 až -30 °C) a nařezání na tenké plátky, kdy mohou být použity různé šířky řezů (desítky mikrometrů). Ačkoli se pro uchycení kryořezů používají speciální mikroskopická sklička (např. SuperFrost Plus pokrytá adhezivní vrstvou), pro běžně používaná podložní sklička mohou být pro zlepšení adheze použity i roztoky glycerolové želatiny nebo želatiny kamence chromitého [44].

2.2 Nanočástice

2.2.1 Nanotechnologie

Za zakladatele oboru nanotechnologie je považován Richard Feynman, který značně předběhl dobu a už v 50. letech minulého století předpověděl běžné využití nanomateriálů v budoucnosti. Jeho vize se začala naplňovat v 80. letech 20. století, kdy se začaly objevovat a využívat první nanoobjekty. Od té doby jsou nanotechnologie na vzestupu a zasahují do četných odvětví lidské činnosti. Nanotechnologiemi se obecně rozumí každý materiál o velikosti v řádu nanometrů, který nachází uplatnění v reálném světě [46].

2.2.2 Nanomateriály

Nanomateriál se definuje jako materiál s alespoň jedním vnějším rozměrem v řádu nanometrů (1–100 nm) s vlastnostmi, které lze připsat přítomnosti těchto rozměrů. Nanomateriály se rozumí i materiály s vnitřní nebo povrchovou strukturou v řádu nanometrů. [47–49]. Nanomateriály nachází uplatnění průmyslu (elektronika, automobilový a letecký průmysl) i v mnoha předmětech denní potřeby (zubní pasty, opalovací krémy) [49].

Rozdělení nanomateriálů dle rozměrů

Nanomateriály můžeme rozdělit podle počtu rozměrů v řádu nanometrů na tři hlavní skupiny:

- nanomateriály s jedním rozměrem v nanoměřítku (tenké filmy a vrstvy)
- nanomateriály se dvěma rozměry v nanoměřítku (nanotrubice a nanodrátky)
- nanomateriály se třemi rozměry v nanoměřítku (nanočástice) [46]

2.2.3 Druhy nanočástic

Nanočástice (NPs, z anglického *nanoparticles*) jsou nanomateriály, které mají všechny tři rozměry v řádu nanometrů. Dají se dále rozdělit podle několika kritérií.

Rozdělení dle struktury

- nanoklastry – částice jsou vázány slabými interakcemi
- nanokrystaly – částice jsou vázány kovalentními vazbami
- kvantové tečky – polovodičové nanočástice [46, 50]

Rozdělení dle chemického složení a vlastností

- polovodičové nanočástice, např. kvantové tečky
- kovové nanočástice, které získávají své unikátní vlastnosti díky relativně volným elektronům na svém povrchu (např. zlaté nebo stříbrné NPs)
- nanočástice oxidů kovů (např. TiO_2 NPs)

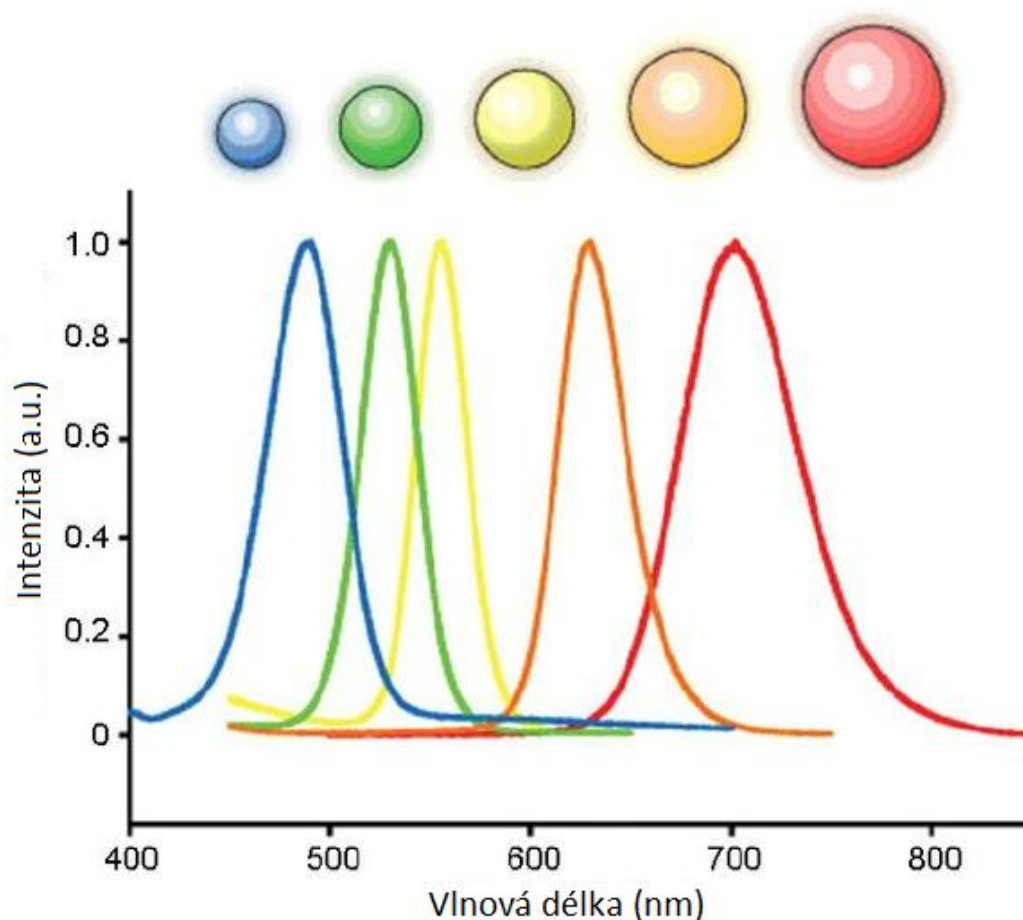
- organické a biologické nanočástice (např. peptidové NPs) [51]
- hybridní a kompozitní nanočástice složené ze dvou a více výše uvedených druhů nanočástic (např. Au/Cu₂O NPs, tedy nanočástice oxidu kovu a polovodičová) [52]

Rozdělení dle původu

- přírodní, vznikající například při lesních požárech, erozích, vulkanickou aktivitou a biologickými procesy
- syntetické, které jsou vyráběny cíleně, ale mohou vznikat i samovolně při spalovacích procesech [49]

2.2.4 Kvantové tečky

Kvantové tečky (QDs, z anglického *Quantum Dots*) jsou sférické polovodičové nanokrystaly o velikosti 2 až 100 nm, obsahující okolo 200–10 000 atomů, s unikátními optickými a elektrickými vlastnostmi. Netvoří pravé roztoky, ale koloidní vodné disperze. V současné době nachází uplatnění především v medicíně nebo v elektrotechnickém průmyslu. Jednou z nejcennějších vlastností kvantových teček je jejich schopnost jasné a vysoce stabilní fluorescence, díky čemuž mohou být uplatňovány například v biomedicíně pro zobrazování za účelem zaměření a sledování specifických biologických procesů a změn v organismu. Barvu fluorescenčního záření určuje velikost kvantových teček, z čehož plyne, že barva záření je snadno nastavitelná již při samotné syntéze, jak je znázorněno na Obrázku 10 [4, 47, 53].

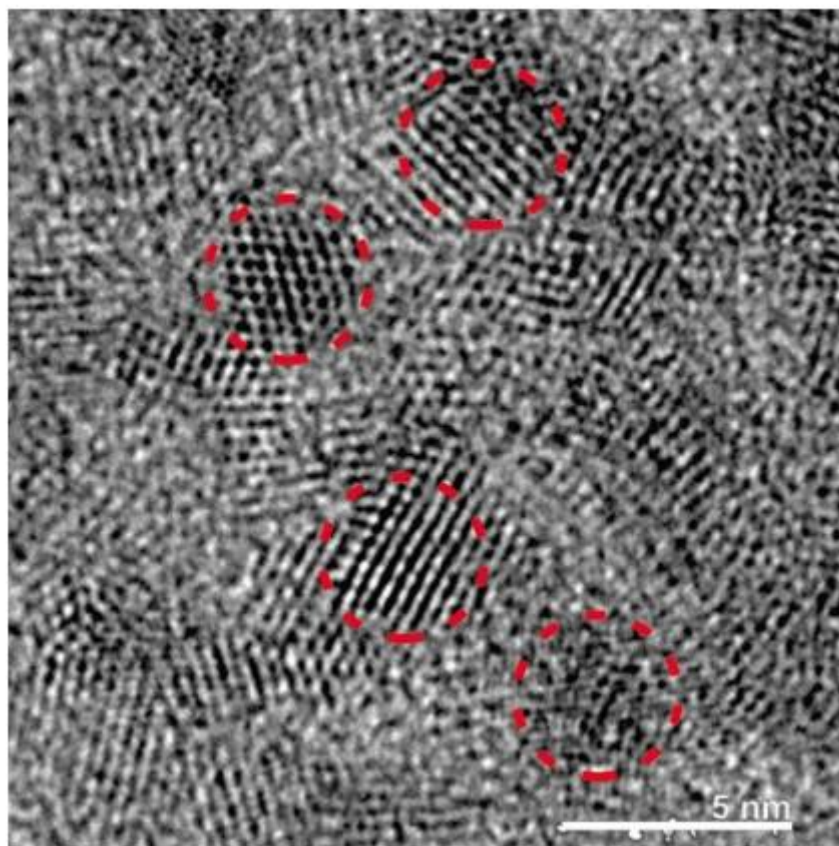


Obrázek 10: Závislost barvy fluorescence kvantových teček na jejich velikosti [54]

V současnosti se rovněž zkoumá možnost jejich použití v systémech s cíleným transportem léčiv. I přes nesporné výhody a možnosti jejich uplatnění v celé řadě odvětví lidské činnosti mohou kvantové tečky představovat rizika pro životní prostředí i pro lidské zdraví. Jejich toxicita představuje komplexní problém, jelikož je závislá na mnohých fyzikálních, chemických a environmentálních faktorech [4, 55].

Stavba kvantové tečky

Kvantové tečky se skládají z krystalického jádra, které tvoří aktivní centrum (viz Obrázek 11), a některé QDs mají navíc i další vrstvu tzv. obal. Jádro kvantových teček je typicky složeno z atomů přechodného kovu (tradičně kadmium) a chalkogenu (sulfidy, selenidy a telluridy) [51]. U QDs je, díky jejich velkému povrchu, v nejvyšší vrstvě přístupno velké množství atomů přítomných v jádře, které často nemají zcela zaplněné valenční orbitály, což vede k jejich nestabilitě a reaktivitě. Z tohoto důvodu je přidán obal tvořený dalším polovodičem (často se používají ZnS, SiO₂, ZnSe, CdS, CdSe [2, 3]), který je biokompatibilní a má za úkol pasivovat povrch, zvýšit efektivitu fluorescence a snižovat toxicitu, zabránit oxidaci, slábnutí fluorescence a zvyšuje chemickou stabilitu [4].



Obrázek 11: Fotografie CdTe QDs o průměru 3,5 nm ve vysokém rozlišení z transmisního elektronového mikroskopu [56]

Syntetizované kvantové tečky jsou hydrofobní, což značně limituje možnosti jejich biologického využití. Pro zlepšení jejich vlastností může být přidána vnější vrstva, jejíž úlohou je zlepšit rozpustnost QDs a zachovat je přitom v neagregovaném stavu, jedná se o tzv. povrchovou modifikaci. K tomu se používají povrchové surfaktanty, kupříkladu

merkaptopropionová kyselina nebo polyethylenglykol, které mohou být dále konjugovány se zaměřovacími molekulami (protilátky, ligandy), které navedou QDs do specifických orgánů. Ačkoli výsledky zobrazování pomocí QDs jsou povzbudivé, je třeba brát v potaz, že QDs obsahují vysoce reaktivní formu kadmia. Proto je třeba podrobně prozkoumat jejich toxikologické a farmakologické vlastnosti, včetně bezpečné dávky, a charakterizovat materiál v závislosti na způsobu přípravy a použití různých povrchových modifikací [4]. V současnosti jsou nejrozšířenější formou kademnatých QDs CdSe a CdTe zapouzdřené do různých obalů, jak je uvedeno výše.

2.3 Ekotoxikologie

Termín ekotoxikologie byl poprvé použit roku 1969 francouzským vědcem René Truhautem jako rozšíření oboru toxikologie, která se zabývá pouze vlivem jedovatých látek na člověka, o ekologickou stránku, tedy o vliv na ostatní živé organismy. Dle starších definic je toxikologie popisována jako testování toxicity na jednom nebo více komponentech jakéhokoli ekosystému. Zkoumá efekty jevů na individuální organismy a ekologické účinky polutantů [57].

V současné době se ekotoxikologie definuje jako věda o kontaminantech v biosféře a jejich efektech na její jednotlivé složky, včetně člověka. Ekotoxikologie je komplexní věda, která spojuje dohromady mnoho vědních disciplín a metod, od geologie a geografie až po hydrochemii a lékařství, a zabývá se negativními efekty polutantů od molekulárních procesů, až po vliv na celé populace a ekosystémy [58].

Současná potřeba ekotoxikologie

Potřeba rozvoje ekotoxikologie se objevuje především kvůli rozvoji průmyslu, vědeckému pokroku a vývoji stále nových materiálů, které mohou pronikat do přírody. Dříve bylo znečištění poměrně jednoduchou záležitostí zahrnující především kovy, pesticidy nebo organické chemikálie, avšak komplexnost znečištění se díky objevům a využití nových materiálů stále zvyšuje. [52, 53].

V ekotoxikologii se setkáváme s několika významnými pojmy:

- biosystém je živá soustava na kterémkoli stupni žebříčku hierarchické biotické organizace (od jednotlivých buněk po celé ekosystémy)
- toxikant je chemická látka nebo jejich směs, která již v relativně nízkých koncentracích negativně působí na biosystém
- expozice je stav, kdy jsou biosystém a toxikant v přímém kontaktu
- účinek je změna, kterou vyvolá toxikant v biosystému
- kontaminant je látka, která znečišťuje životní prostředí [60]
- xenobiotikum je cizorodá látka, která není běžně přítomna v životním prostředí a není považována za normální stavební složku biologických systémů, na rozdíl od kontaminantu však životní prostředí neznečišťuje [61]

Rozdělení ekotoxikologie

Ekotoxikologie se dá obecně rozdělit podle různých kritérií: podle způsobu zavedení látky do prostředí, chemické povahy toxikantu, praktických aplikací a charakteru příjemce [60].

Významné je především rozdělení ekotoxikologie na terestrickou, tedy pozemní, kdy expozice probíhá v půdě, vzduchu či z přijaté potravy nebo dermálně, a akvatickou,

probíhající ve vodném prostředí, kdy testovací organismy přijímají toxikant z vodného roztoku nebo sedimentu [57, 62, 63].

2.3.1 Ekotoxicitá

Ekotoxicitá je vlastnost látek, které při výskytu v životním prostředí představují akutní nebo pozdní hrozbu, v přírodě se akumulují nebo toxicky působí na živé biotické systémy [64].

Stanoví se podle třech kritérií:

- LC_{50} – letální koncentrace, při které umírá 50 % z celkového množství sledovaných organismů
- EC_{50} – efektivní koncentrace, při níž dochází u 50 % z celkového množství sledovaných organismů ke změnám v chování
- IC_{50} – inhibiční koncentrace, při které dojde u 50 % z celkového množství sledovaných organismů k zamezení růstu [64]

2.3.2 Biotesty

Biotest (*Bioassay*) lze popsat jako proces, při němž je testovací organismus vystavován působení definovaných koncentrací toxikantu po přesně stanovenou dobu. Celý proces musí být snadno kontrolovatelný, výsledky testu se snímají detekčním systémem (jako který slouží testovací organismus) a jsou pozorovány nastávající změny. Z reakce detekčního systému je možno rozpoznat, zda je pro něj sledovaná látka za těchto podmínek toxická, či nikoli [59].

Ekotoxikologické biotesty jsou samostatným odvětvím, které se nevztahuje k člověku, ale k ekosystémům nebo k matricím (půdní a vodní ekosystémy, odpady, chemické látky). Dříve byla mortalita v podstatě jediným sledovaným indikátorem, v dnešní době se již sleduje řada dalších faktorů, a to především dlouhodobějších a hůře detekovatelných, jako je karcinogenita, mutagenita, vliv na schopnost reprodukce a růstu. Ačkoli se zdraví ekosystému určuje na třech úrovních, kterými jsou individuální, populační a na úrovni společenstva, biotesty se zabývají pouze působením toxikantů na individuální organismy [59].

Druhy ekotoxikologických biotestů

Ekotoxikologické biotesty lze rozdělit podle několika různých kritérií:

- doby expozice – akutní, subchronické (subakutní, semiakutní), chronické
- pokročilosti designu testovacího systému na čtyři generace:
 - klasické
 - mikrobiotesty
 - biosenzory, biomárky a biosondy
 - online systémy s dálkovým přenosem dat
- trofické úrovně testovacích organismů – producenti, konzumenti, destruenti
- testované matrice – půda, vzduch, voda, odpad, sediment, chemická látka
- spektra testovacích organismů – jednodruhové a vícedruhové
- typu testovaného vzorku – čisté chemické látky, přírodní vzorky
- způsobu přípravy vzorku
- stupně komplexnosti detekčního systému – od nejjednodušších, což jsou enzymy, po nejsložitější: živé organismy, populace, terénní experimenty
- způsobu vyhodnocení
 - letální efekt způsobující úmrtí nebo imobilitu organismu

- subletální efekty, které způsobí změny v chování organismu, kupříkladu sníženou mobilitu
- fyziologická aktivita, kde se sledují přírůstky (např. počet buněk populace, hmotnost organismu, přírůstek kořene), enzymatická aktivita, membránové efekty, náchylnost k napadení škůdci, chorobami nebo parazity
- malformace a teratogenita
- speciální testy pro určení jiných efektů na organismus, než které jsou běžně sledovány – genotoxicita, mutagenita,
- další biotesty – testy bioakumulace a biodegradability, které nejsou zařazovány do ekotoxikologických biotestů z hlediska evaluace toxicity nebo letálních efektů [59].

Testovací organismy

Testovací organismy lze rozdělit podle trofické úrovně na producenty, konzumenty a destruenty. Zapojením většího množství testovacích organismů a jejich různých druhů je získána komplexnější představa o působení sledovaného toxikantu, protože výsledky jsou druhově nepřenositelné. Dnes se jako testovací organismy používají nejrůznější organismy: bakterie, sinice, řasy, mechy, lišejníky, vyšší rostliny, půdní a vodní organismy i teplokrevní obratlovci, nejčastěji hlodavci, ve výjimečných nutných případech i primáti [59].

End-pointy

End-point je výsledek ekotoxikologické studie určující nebezpečí zkoumané látky. Mezi end-pointy se řadí mortalita, změny v chování, schopnost reprodukce, fyziologické a biochemické změny a další. End-pointy se dělí na akutní a chronické [62].

Bioakumulace a translokace

Látka může být pro testovací organismus více nebezpečná, pokud dochází k jejímu nadměrnému hromadění tedy bioakumulaci. Ta je definována jako proces, kterým v sobě organismus akumuluje chemikálie přímo z nebiotického prostředí (voda, vzduch, půda), nebo je přijme společně s živinami. Možnost bioakumulace je ovlivněna chemickou odolností látky a její koncentrací v životním prostředí. Pro každou chemikálii či prvek je typická bioakumulace v určitých oblastech, tkáních či orgánech organismu [61] (například u člověka dochází k bioakumulaci kadmia v ledvinách [55]). Látky bioakumulované z půdy se mohou ukládat v kořeni, nebo mohou být přesunuty do stonku a dalších částí rostliny, včetně semen. Tomuto procesu se říká translokace [65].

2.3.3 Toxicita a bioakumulace kadmia v rostlinách

Navzdory tomu, že je toxicita kadmia aktivně zkoumána již více než 50 let, vědomosti v této oblasti nejsou ještě zdaleka úplné. Přítomnost kadmia působí na růst vyšších rostlin negativně, snižuje délku kořene rostlin a hmotnost sušiny, působí inhibičně na proces fotosyntézy a snižuje koncentraci nutrientů v těle rostliny [65]. Navzdory rozsáhlému výzkumu v oblasti toxicity kadmia však zůstává mnoho oblastí neprozkoumaných [4].

Toxicita a bioakumulace QDs

Nanočástice mají obecně jiné vlastnosti než makro formy týchž prvků či sloučenin. U nanočástic díky jejich velikosti převládají především kvantové efekty, jako je efekt potenciálové jámy a kvantového vězení, který nastává, jsou-li kovové a polovodičové nanočástice menší, než je Bohrovův rádius (1–5 nm).

Toxicita QDs je připisována reaktivním kyslíkovým skupinám a uvolňování Cd^{2+} z jádra [2], čemuž se dá předejít použitím vnějšího polovodičového obalu s širším zakázaným pásem (ZnS , SiO_2 , ZnSe [2]). Toxicita QDs je především dána jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, například velikostí, nábojem, koncentrací, biologickou aktivitou vnějšího obalu či povrchového surfaktantu (např. funkční skupiny), oxidativní, fotolytickou a mechanickou stabilitou [1, 55]. Přidáním vnější vrstvy organické povahy, lze některé vlastnosti modifikovat. Vlastnosti této vrstvy pak určují toxicitu QDs, jejich příjem, bioakumulaci i translokaci v rámci organismu.

QDs s kladně nabitým obalem (polyethylenimin) pronikají do rostlin snáze než QDs se záporně nabitým obalem (polyakrylová kyselina), a to dokonce i pokud mají výrazně větší hydrodynamický průměr (rozdíl ve velikostech až 15,8 nm) [66]. Obecně však zvyšující se velikost QDs a jejich případná aglomerace či agregace v okolním médiu brání jejich příjmu a následné účinné translokaci rostlinnými tkáněmi [67].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Metoda LIBS je pro analýzu biologických vzorků, včetně rostlinných tkání, vhodná hned díky několika aspektům. Jedná se o metodu s relativně jednoduchou instrumentací a nízkými náklady na provoz, metoda je rychlá, ukazuje výsledky téměř v reálném čase, dokáže sledovat více analytů současně, včetně lehkých prvků, a je schopna stanovit prostorovou distribuci těchto analytů v dostatečném rozlišení. Dokáže rovněž analyzovat vzorky o relativně velké ploše (jednotky až nižší desítky cm²), což je podmínkou pro analýzu distribuce analytu v rostlinných vzorcích [68, 69]. Díky těmto skutečnostem může být metody LIBS využito například v zemědělství, kde se dá využít jako rychlá *in situ* metoda, dále v potravinářství nebo genetickém inženýrství. V zemědělství má největší význam detekce nutrientů a toxikantů v rostlinách [69]. V současnosti se metoda LIBS ve směru analýzy rostlinných vzorků ubírá především směrem detekce absorpce kovů a jejich transportu v rostlinách [70].

Detekce vybraných prvků v rostlinách

Využití metody LIBS pro analýzu rostlinných tkání již bylo studováno v řadě odborných publikací, jak je souhrnně uvedeno v přehledových člancích [69, 71]. Byla sledována přítomnost makronutrientů (C, O, P, K, S, Ca, Mg), mikronutrientů (Fe, Cl, Mn, B, Cu, Zn), ale i těžkých kovů (Cd, Pb, Cr, Co) a dalších neesenciálních prvků (Li, Sr, Be, Sn, V, Au).

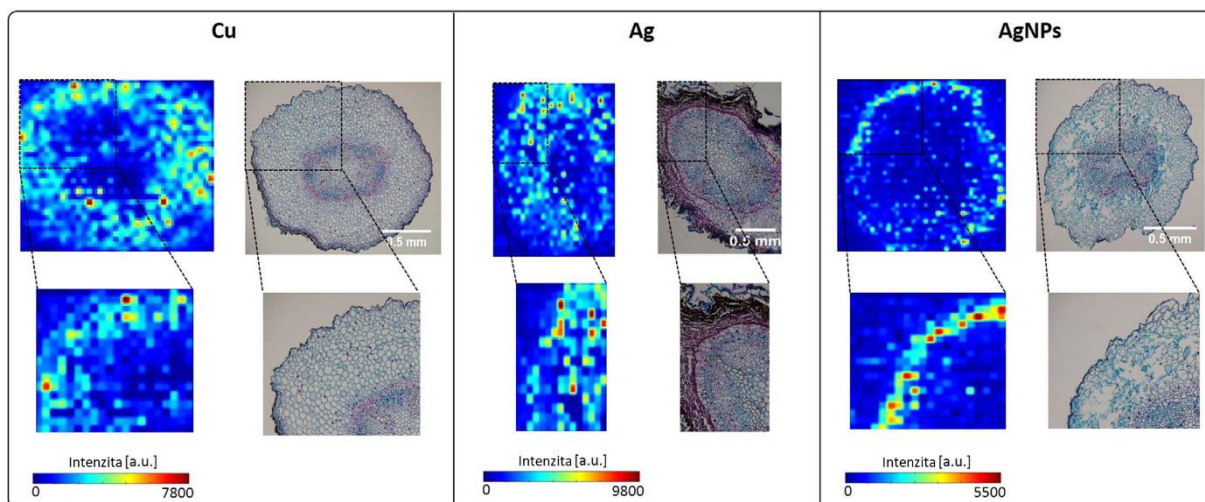
Stanovením prostorové distribuce s rozlišením 100 μm u vybraných těžkých kovů, včetně kadmia, metodou LIBS za použití laseru o vlnové délce 795 nm se ve své práci zabýval Kaiser J. a kol. Cílem této studie byla kvalitativní detekce Cd a Pb v listech a kořenech slunečnice roční (*Helianthus Annuus* L.), expozice rostlin probíhala po dobu 5 dní v hydroponických podmínkách, kontaminanty byly přidány v podobě solí (CdCl₂ a Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O). Oba kovy se podařilo detekovat a rozdíly v jejich distribuci byly diskutovány společně s vhodností použití metody LIBS pro analýzu rostlin [71].

Další práce zabývající se distribucí vybraných kovů, Au a Cu, v listech modelové rostliny slunečnice roční (*H. Annuus*) byla vydána Galivou M. a kol. Oba kovy se podařilo detekovat metodou LIBS, za použití laseru o vlnové délce 532 nm. U mědi byl zkoumán její přirozený výskyt v rostlině, proto byl získaný signál citelně nižší a měď byla rozložena téměř rovnoměrně v celém modelovém organismu. V porovnání se stříbrnými ionty, které do rostliny přecházely z cíleně kontaminované vodného roztoku AgNO₃ o koncentraci 1 mmol·l⁻¹ v průběhu osm dní trvající expozice, stříbro pak bylo detekováno v nejvyšší míře v centrální cévě [20].

Detekce nanočástic v rostlinách

Detekci nanočástic v rostlinných vzorcích metodou LIBS se doposud zabývaly pouze tři studie. První z nich je práce vydaná Krajcarovou L. a kol., jež je zaměřena na detekci stříbrných nanočástic (AgNPs, z anglického *Ag nanoparticles*) v řezech kořene modelové rostliny bobu obecného (*Vicia faba* L.). Jedná se o vůbec první studii zabývající se stanovením prostorové distribuce NPs v rostlinách metodou LIBS. V práci byla dále sledována i distribuce stříbrných a měďnatých kationtů, ty sloužily k diskuzi rozdílné distribuce iontů a nanočástic. Expozice testovacích organismů třem testovacím látkám (CuSO₄, AgNO₃ a AgNPs) probíhala po dobu sedmi dní. Po uplynutí stanovené doby experimentu byly připraveny kryorezy kořenů rostlin o šířce 40 μm. Takto připravené vzorky

byly analyzovány metodou LIBS ve dvoupulzním uspořádání (vlnové délky laserů byly 266 a 1 064 nm) s prostorovým rozlišením 50 μm . Výsledky této studie nejen prokázaly, že je metoda LIBS vhodná pro detekci NPs v rostlinných tkáních, poukázaly navíc na odlišné chování Cu^{2+} a Ag^+ kationtů oproti AgNPs. Jak je patrné z Obrázku 12, kationty snadno pronikaly do vnitřních tkání rostlin, kdežto AgNPs se adsorbovaly na povrch kořene [44].

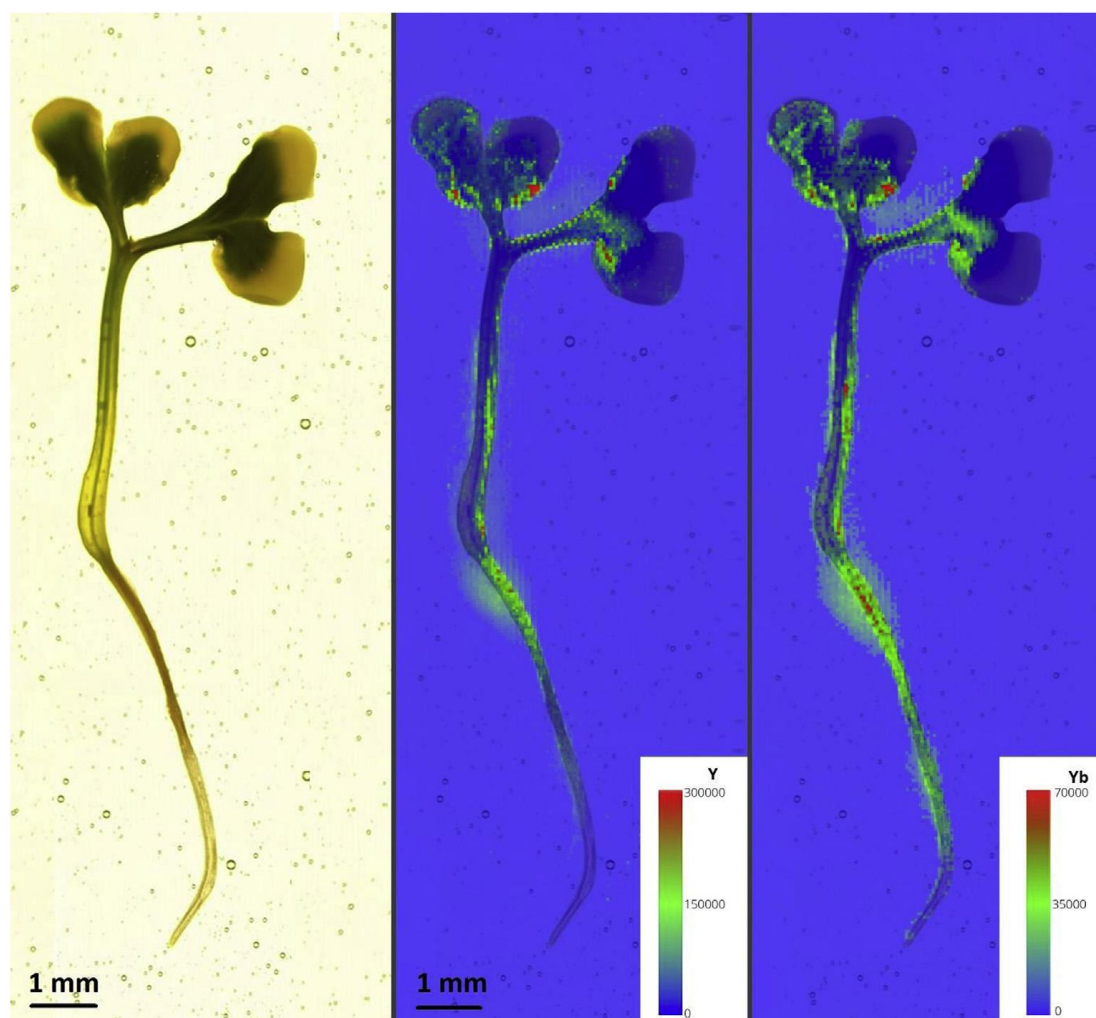


Obrázek 12: Porovnání distribuce kationtů mědi a stříbra přijatých z roztoku jejich solí s distribucí stříbrných nanočástic [44]

Modlitbová P. a kol. se ve své studii zabývali sledováním toxicity a distribuce CdTe QDs pro modelovou vodní rostlinu okřehek menší (*Lemna minor* L.). V této práci byly testovány CdTe QDs se dvěma různými povrchovými surfaktanty: glutathionem (GHS) a 3-merkaptopropionovou kyselinou (MPA, z anglického *mercaptpropionic acid*) a jejich působení bylo porovnáno s pozitivní kontrolou, chloridem kademnatým. Expozice testovacích organismů trvala sedm dní, po jejím ukončení byly stanoveny makroskopické end-pointy monitorující toxicitu vybraných kontaminantů (inhibice rychlosti růstu rostlin a inhibice nárůstu biomasy), dále byla stanovena bioakumulace kadmia (celkový obsah) následovaný sestavením 2D map distribuce kadmia v listech okřehku menšího s rozlišením 200 μm (dvoupulzní LIBS uspořádání, lasery o vlnových délkách 266 a 1 064 nm). Výsledky této studie poukázaly na srovnatelnou toxicitu MPA-QDs a GHS-QDs. Bioakumulace byla kvantitativně závislá na koncentraci kadmia v okolním médiu, jeho prostorová distribuce však nezávisela na jeho zdroji. Měření transmisní elektronovou mikroskopií (TEM, z anglického *Transmission Electron Microscopy*) ukázalo, že nedocházelo k adsorpci QDs nebo jejich agregátů na povrch rostliny, QDs rovněž nebyly detekovány uvnitř rostlinných tkání. Výsledky naznačují, že bioakumulované kadmium pochází z volných iontů kadmia, které byly uvolněny do testovacího média z jader QDs, z čehož plyne, že zvolené surfaktanty nejsou pro stabilizaci QDs dostatečné a je vhodnější použít obaly např. již zmíněný ZnS či SiO_2 [2].

Nejnovější odborná publikace soustředící se na problematiku detekce NPs v rostlinných tkáních byla rovněž vydána Modlitbovou P. a kol. Práce se zabývá působením foton up-konverzních nanočástic (UCNPs, z anglického *Photon Up-conversion Nanoparticles*) na modelové rostliny okřehek menší (*L. minor*) a ředkev setou (*R. sativus*). Testovány byly UCNPs/ SiO_2 -COOH (nanokrystaly NaYF_4 dopované kationy Er^{3+} a Yb^{3+} s karboxylovaným

obalem oxidu křemičitého), jejich působení bylo porovnáno s pozitivní kontrolou (směs chloridů Y, Yb a Er). Expozice *L. minor* probíhala po dobu 168 hodin, *R. sativus* po dobu 72 hodin, po jejich ukončení byly stanoveny makroskopické end-pointy určující toxicitu kontaminantů (délka kořene a hypokotylu pro *R. sativus*, a plocha listu pro *L. minor*), celkový obsah Y, Yb a Er, a dále byly vybrané rostliny vysušeny a zafixovány v epoxidové pryskyřici pro následnou LIBS analýzu (byl použit laser o vlnové délce 532 nm). Distribuce Y a Yb byla stanovena s prostorovým rozlišením 100 μm , pro ablaci veškeré hmoty bylo měření na stejné ploše vícekrát opakováno. Výsledky LIBS experimentu poukázaly na odlišnou distribuci Y a Yb z UCNP $\text{s/SiO}_2\text{-COOH}$ než z jejich chloridů a rovněž naznačují, že UCNP $\text{s/SiO}_2\text{-COOH}$ se mohou pohybovat cévami rostlin a pronikají až do listů rostliny a zároveň se mohou adsorbovat na její povrch (viz Obrázek 13), tyto závěry byly také potvrzeny foton up-konverzními skeny rostliny. Výsledky této studie poukázaly nejen na vysokou stabilitu UCNP $\text{s/SiO}_2\text{-COOH}$ ve vodných roztocích během expozice rostlin, ale především na jejich snadnou distribuci v rámci celé rostliny s velkým potenciálem pro následný trofický transfer [72].



Obrázek 13: Mapy distribuce Y a Yb z UCNP $\text{s/SiO}_2\text{-COOH}$ v *R. sativus* v porovnání s jejím mikroskopickým snímkem [72]

Ke stanovení bioakumulace a translokace analytu v modelovém organismu je nutno zjistit jeho prostorové rozložení. Pro mapování prostorového rozložení NPs v rostlinných vzorcích se používá hned několik různých technik. Jedná se především o TEM, rastrovací elektronovou mikroskopii (SEM, z anglického *Scanning Electron Microscopy*), Ramanova mikroskopie, fluorescenční mikroskopie, LA-ICP-MS, nebo techniky využívající rentgenového záření [5]. K detekci prostorového rozložení prvků je možno použít například mikroradiografii nebo rentgenovou mikroradiografii [71]. Výše uvedené metody jsou finančně i časově nákladné, a nejsou proto vhodné pro analýzu velkého množství vzorků nebo vzorků o velikosti v řádu centimetrů čtverečních. Využití metody LIBS se tedy jeví jako vhodná alternativa [5].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Milli-Q voda
- hydroxid sodný Lachner, CAS 1310-73-2
- chlorid kademnatý Sigma Aldrich, CAS 10108-64-2
- citronan sodný dihydrát Sigma Aldrich, CAS 6132-04-3
- 3-merkaptopropionová kyselina Sigma Aldrich, CAS 107-96-0
- telluričitan sodný Sigma Aldrich, CAS 10102-20-2
- borohydrid sodný Sigma Aldrich, CAS 16940-66-2
- (3-merkaptopropyl)-trimethoxysiloxan Sigma Aldrich, CAS 4420-74-0
- ethanol, 96% Lachner, CAS 64-17-5
- křemičitan sodný Merck, CAS 1344-09-8
- CRM, Cd 1 000 mg/ml v HNO₃ Analytika spol. s r.o., 2 % HNO₃

4.2 Použité přístroje a software

4.2.1 Přístroje

- Sci-Trace LIBS systém (AtomTrace, Česká republika)
 - Ablací komora s pohyblivým stolem (AtomTrace, Česká republika)
 - Série dielektrických laserových zrcadel (ThorLabs, USA)
 - CFR 400 laser (Nd:YAG 532 nm, délka pulzu 10 ns, průměr laserového paprsku 7 mm Quantel, Francie)
 - Echelle spektrometr Emu-65 (190–1 100 nm, Catalina Scientific, USA)
 - Czerny-Turner spektrometr Shamrock (LOT Oriel, Německo)
 - ICCD detektor iStar 734 (Andor, Spojené království)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Nizozemí)
- FP-8500 Spektrofluorometr (Jasco, USA)
- ICP-OES spektrometr iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Optický mikroskop Stemi 2000-c (Zeiss, Německo)

4.2.2 Software

- Andor Solis (Andor, Spojené království)
- Kestrel (Catalina Scientific, USA)
- AtomAnalyzer (AtomTrace, Česká republika)
- RStudio (RStudio, inc. USA)
- Photoshop CC (Adobe, USA)
- Origin 2019 (OriginLab, USA)

4.3 Syntéza a silanizace kvantových teček

Ve vodě rozpustné CdTe kvantové tečky byly připraveny jedнокrokovou syntézou. Milli-Q voda, používaná ve všech experimentech, prošla demineralizací za pomoci reverzní osmózy a byla dále vyčištěna za použití Millipore RG (Merck KGaA, Německo). V 70 ml této Milli-Q vody bylo rozpuštěno 69 mg chloridu kademnatého, poté bylo přidáno 200 mg dihydrátu

citrátu sodného a 194 μ l MPA. Následně bylo pH roztoku upraveno přidáním 10 kapek 1 M roztoku hydroxidu sodného na hodnotu 10. Posléze bylo do roztoku přidáno 18 mg telluričitanu sodného a v posledním kroku bylo rychle přisypáno 100 mg borohydridu sodného. Jednotlivé chemikálie byly do roztoku kvantitativně převáděny Milli-Q vodou o celkovém objemu 15 ml, celkový objem roztoku tak činil 85 ml. Roztok byl v olejové lázni pod refluxem za stálého míchání zahříván při teplotě 95 °C po dobu šesti hodin.

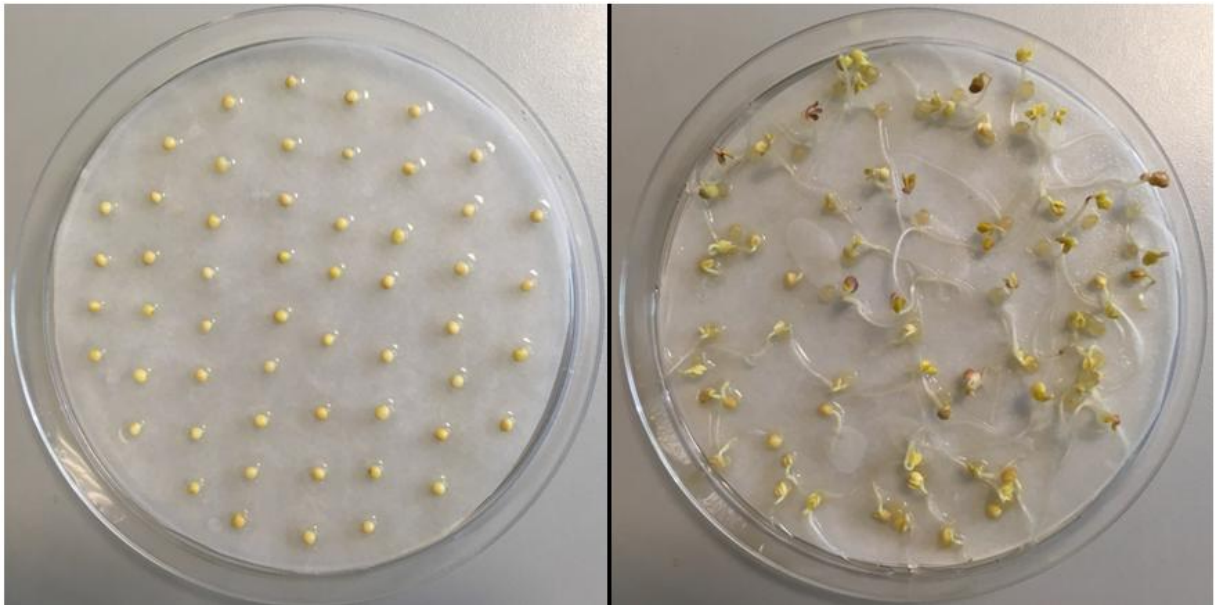
10 ml vodné disperze CdTe QDs, získaných z předchozího kroku syntézy, bylo po dobu dvou hodin mícháno s roztokem obsahujícím 10 ml ethanolu a 1,5 ml (3-merkaptopropyl)-trimethoxysiloxanu. Poté byl celý roztok převeden do dialyzační membrány (Roth, Membra-Cel(TM), celulóza), kde byl za mírného míchání dialyzován proti 2 l Milli-Q vody, s pH upraveným na hodnotu 11 přidavkem odpovídajícího množství 1 M roztoku NaOH, po dobu dalších dvou hodin. Poté byly do roztoku za stálého míchání velice pomalu přikapávány 2 ml křemičitanu sodného tak, aby se stihl v reálném čase rozmíchat a nedocházelo ke tvorbě sraženin. Takto připravený roztok se následně míchal po dobu dalších 72 hodin.

Pro oba druhy kvantových teček byla změřena emisní maxima (nm) na spektrofluorometru, a následně byl stanoven jejich hydrodynamický průměr (nm) metodou dynamického rozptylu světla (DLS, z anglického *Dynamic Light Scattering*). Do testů toxicity byly připraveny vodné disperze CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs o nominální koncentraci 20 a 200 μ M Cd a reálná koncentrace Cd byla změřena na ICP-OES. Syntéza i silanizace QDs proběhla na oddělení Bioanalytické instrumentace, Ústavu analytické chemie, Akademie věd ČR, pod dohledem Ing. Karla Klepárníka, CSc.

4.4 Test toxicity

Naklíčení semínek S. alba

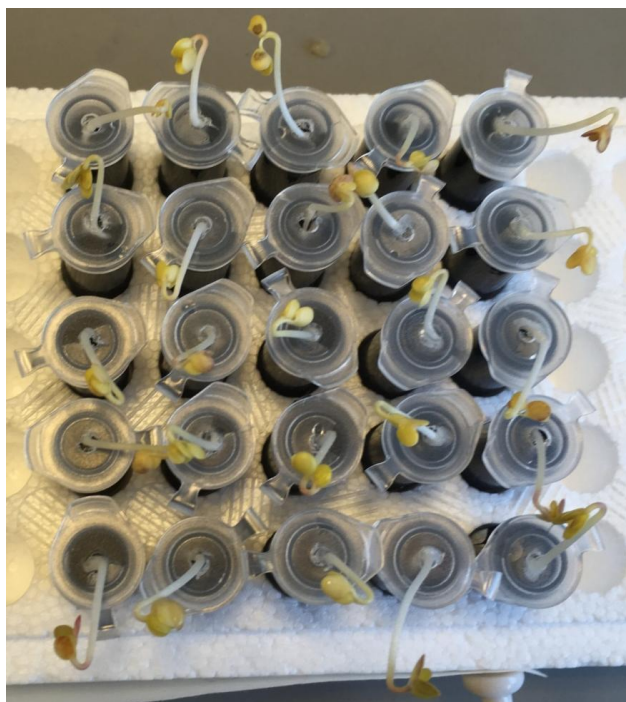
Do dvanácti Petriho misek byl vložen filtrační papír, který byl navlhčen destilovanou vodou ze stříčky tak, aby malé množství vody zůstalo na dně nevsáknuto. S rozstupem přibližně 1 cm bylo na dno každé Petriho misky na filtrační papír pinzetou přeneseno 60 až 70 semen hořčice seté (*S. Alba*), která byla den předem namočena v destilované vodě. Petriho misky byly následně uzavřeny a ponechány po dobu 3 dnů ve tmě (viz Obrázek 14).



Obrázek 14: Vlevo semena *S. Alba* v Petriho misce, vpravo naklíčené rostliny *S. Alba* v Petriho misce

Expozice

Po uplynutí stanovené doby byly naklíčené rostliny přeneseny do speciálně upravených 2 ml mikrozkušavek typu Eppendorf. Tyto mikrozkušavky měly ve svém víčku vyvrtány díru o průměru přibližně 2 mm, kterou bylo možno protáhnout kořen naklíčené rostliny. Spodní část zkumavek byla obalena černou izolepou, aby byly simulovány podmínky, kdy ke koření do půdy neproniká světlo. Do 25 zkumavek byly převedeny vždy 2 ml jednoho typu roztoku nebo vodné disperze: destilovaná voda, která sloužila jako kontrola; roztok CdCl_2 o nominální koncentraci 20 a 200 μM Cd, který byl zvolen jako pozitivní kontrola, a především vodné disperze CdTe QDs o nominální koncentraci 20 a 200 μM Cd a CdTe/SiO₂ QDs o nominální koncentraci 20 a 200 μM Cd. Do testu byly nasazeny rostliny s pevným a zdravým kořenem a ty byly přeneseny do naplněných zkumavek tak, aby kořen rostliny byl zcela ponořen v disperzi a stonek rostliny zůstal nad mikrozkušavkou (Obrázek 15). Takto přichystané vzorky byly přeneseny do kultivační místnosti, kde po dobu 72 hodin probíhala expozice.



Obrázek 15: Zahájení expozice rostlinných vzorků

Ukončení expozice

Po dvaasedmdesáti hodinách byly již narostlé rostliny (viz Obrázek 16) opatrně vytaženy z mikrozkmavek. Kvůli vysoké variabilitě biologických vzorků byla délka kořene změřena na 10 vybraných rostlinách, ta byla následně statisticky vyhodnocena Mann-Whitney U testem, který sloužil k určení statisticky významných rozdílů mezi délkami kořenů rostlin v kontrolní skupině a těmi exponovanými různými zdroji kadmia, a to na hladině významnosti 0,05. Dále bylo vybráno pět nejlépe narostlých a navzájem nejvíce podobných rostlin z každé testovací skupiny pro analýzu LIBS. Vybrané rostliny byly vylisovány, vysušeny a poté upevněny na tenkou vrstvu epoxidové pryskyřice na mikroskopická sklíčka. Test toxicity probíhal na Ústavu experimentální biologie, Přírodovědecké fakulty, Masarykovy univerzity pod dohledem RNDr. Marie Kummerové, CSc. a RNDr. Štěpána Zezulky, Ph.D.



Obrázek 16: Rostliny po 72 hodinách expozice

4.5 LIBS experimenty

4.5.1 Optimalizace parametrů měření

Jak již bylo zmíněno, optimalizace parametrů měření musí probíhat na matici co nejvíce podobné skutečným vzorkům. Pro optimalizaci parametrů měření byly proto v Petriho misce na zvlhčeném filtračním papíře zvlášť vypěstovány další rostliny *S. Alba*. Po čtyřech dnech byly ostříhány jejich listy, které byly díky své velké ploše ideální pro použití při optimalizačním měření. Listy *S. Alba* byly následně vylisovány, vysušeny a upevněny epoxidovou pryskyřicí na mikroskopické sklíčko. Poté byl na každý list automatickou pipetou nanesen 1 μl standardního roztoku kadmia o koncentraci $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato koncentrace byla zvolena na základě předběžného testování, které proběhlo na koncentracích 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, protože se ukázala jako nejvhodnější, jelikož byla měřicí aparaturou snadno a zřetelně detekovatelná. Kapky aplikované pipetou byly vždy nechány schnout při laboratorní teplotě na vzduchu a následně na nich byly optimalizovány jednotlivé parametry měření.

Výběr vhodného spektrometru a spektrální čáry kadmia

Před započítím samotné optimalizace bylo třeba vybrat spektrální čáru kadmia s nejvyšší intenzitou. K tomu účelu byl naměřen standard kadmia, s obsahem 99,99 hm. % kadmia, měření probíhalo na spektrometru typu Echelle a výsledné spektrum bylo průměrem ze sta měření při energii 10 mJ a čas měření po laserovém pulzu (GD) 1,5 μs . Pro výběr spektrometru, na němž měla nadcházející měření proběhnout, byla zvolena nejsilnější spektrální čára kadmia, zjištěná při měření spektrometrem typu Echelle, změřena se stejnými parametry i monochromátorem typu Czerny-Turner a obě získané intenzity byly porovnány.

Optimalizace energie laseru

Výběr energie je vždy kompromisem mezi co nejvyšším získaným signálem a co nejmenší velikostí kráteru, který je ovšem dostatečně hluboký a má přesně definované okraje. Malé velikosti kráterů jsou nutností pro získání dobrého rozlišení 2D rozložení analytu ve vzorku. Proto byla provedena měření na standardu kadmia pro několik různých energií laseru: 5; 10; 15; 20; 25; 30 a 35 mJ, z nichž byla v programu AtomAnalyzer určena intenzita signálu. Při stejných energiích laseru bylo následně provedeno měření na listu rostliny *S. Alba* s aplikovaným 1 μl standardního roztoku kadmia o koncentraci $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a velikosti vzniklých kráterů byly porovnány s příslušnými intenzitami signálu standardu kadmia. Na základě těchto dvou faktorů byla vybrána optimální energie pro další experimenty.

Optimalizace rozteče

Protože cílem měření bylo zjištění 2D distribuce analytu v rostlině *S. Alba*, bylo nutno provést mapování vzorků. Důležitým parametrem při mapování vzorků je rozteč jednotlivých bodů, do kterých bude zaměřen laserový pulz, a kde budou vytvořeny jednotlivé krátery. Pro následnou kvantifikaci bylo nutné, aby byla odablatována veškerá hmota vzorku. Aby nedocházelo ke zkreslení analýzy, je třeba zajistit, aby se jednotlivé vznikající krátery nepřekrývaly. Při zvolené energii byla provedena série experimentů, z průměrů vzniklých kráterů a dostupných technologických možností byla následně zvolena vhodná rozteč pro mapování.

Optimalizace času měření po laserovém pulzu

Pro zvolenou energii laseru a rozteč kroků mapy byla mapována celá zaschnutá kapka kadmia na listu *S. Alba* a výsledky byly vyhodnoceny dle akumulované intenzity kadmia, pro jednotlivé GD vloženy do grafu a navzájem porovnány. Akumulovaný signál byl vypočten v programu AtomAnalyzer jako rozdíl plochy pod integrálem píku kadmia (508,4–508,7 nm) a pozadí odečteného v jeho blízkosti (508,9–509,2 nm). Pro další měření byl používán GD poskytující nejvyšší akumulovaný signál kadmia. Nejprve byly s větším krokem proměřeny GD rovnoměrně v běžně používaném rozsahu, tedy od 100 ns do 2 000 ns, oblast s nejvyššími intenzitami (100 ns až 400 ns) byla poté proměřena s menším krokem důkladněji.

4.5.2 Měření rostlin *S. Alba*

Přichystané rostliny *S. Alba* upevněné do epoxidové pryskyřice na mikroskopické sklíčko byly analyzovány při optimalizovaných parametrech měření. Vzhledem k velikosti testovacích rostlin a časové náročnosti měření bylo využito módu tzv. rychlého mapování, při němž se jednotlivé laserové pulzy opakují s frekvencí 20 Hz. Distribuce analytu byla sledována na celé ploše vylisované rostliny tak, že přes rostlinu byla přeložena mapa, na které se jednotlivá měření opakovala s již optimalizovaným krokem. Velikost těchto obdélníkových map byla obvykle v řádu cm^2 (rozměry v x se pohybovaly od 0,90 cm do 1,41 cm, v ose y od 3,09 cm do 5,27 cm).

Získaná spektra byla zpracována v programu RStudio, od píku kadmia (508,4–508,7 nm) bylo odečteno průměrné pozadí (508,9–509,2 nm) a vypočtena intenzita (a.u.). Spektra byla poté seřazena a byla vykreslena mapa distribuce kadmia, která byla v programu Photoshop CC porovnána s fotografií příslušné rostliny z optického mikroskopu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vlastnosti testovaných látek

Ve vodných disperzích CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs o obou nominálních koncentracích byla před a po expozici naměřena emisní maxima (nm) a hydrodynamický průměr (nm) QDs, výsledky těchto měření jsou uvedeny v Tabulce 1. Z rozdílu hydrodynamického průměru obou druhů QDs před a po expozici je zřejmé, že oba dva druhy QDs nepodléhaly agregaci ani aglomeraci v průběhu testu toxicity a jejich velikosti s ohledem na směrodatnou odchylku měření zůstaly téměř nepozměněny. Velice malá změna hydrodynamického průměru je pak patrná u CdTe/SiO₂ QDs, což poukazuje na zvýšení stability QDs přidáním vhodného obalu. Emisní maxima před a po expozici zůstala téměř nezměněna.

Tabulka 1: Emisní maxima [nm] ve vodných disperzích kvantových teček před a po expozici, průměrný hydrodynamický průměr částic [nm] před a po expozici, změřeno pro obě nominální testované koncentrace CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs (20 a 200 μM), n představuje počet opakování měření

Testovaná látka	Nominální koncentrace před expozicí [μM]	Emisní maximum před expozicí [nm] (n = 2)	Emisní maximum po expozici [nm] (n = 2)	Hydrodynamický průměr před expozicí [nm] (průměr ± SD, n = 6)	Hydrodynamický průměr po expozici [nm] (průměr ± SD, n = 6)
CdTe QDs	20,0	547,9	547,7	2,8 ± 0,9	4,2 ± 1,5
CdTe QDs	200,0		547,9		4,2 ± 1,5
CdTe/SiO ₂ QDs	20,0	544,8	544,9	7,6 ± 2,7	8,4 ± 2,5
CdTe/SiO ₂ QDs	200,0		544,8		8,6 ± 2,0

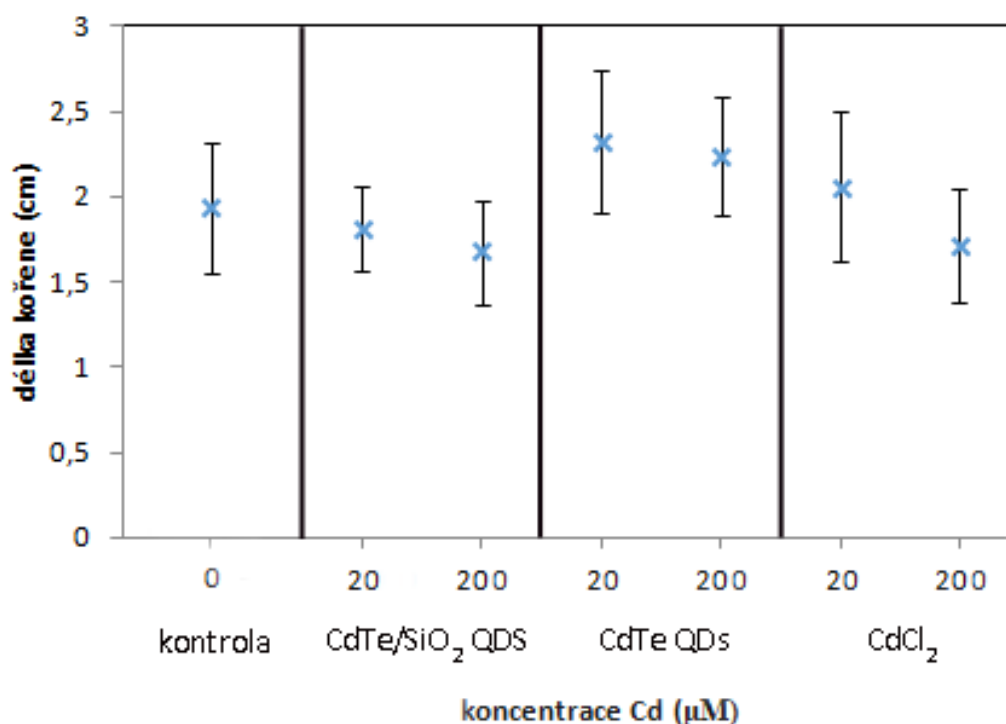
Dále byl pomocí ICP-OES naměřen obsah kadmia v jednotlivých disperzích QDs a v roztoku CdCl₂ před a po expozici, naměřená data jsou uvedena v Tabulce 2. Výtěžnost byla vypočtena jako podíl naměřené a nominální koncentrace, pokles koncentrace kadmia po expozici byl stanoven jako procentuálně vyjádřený podíl naměřené koncentrace kadmia po a před expozicí, odečtené od 100 %. Rozdílné koncentrace ukazují, že kadmium bylo testovacími rostlinami přijímáno nebo mohlo být ve formě kvantových teček adsorbováno na povrch kořenů.

Tabulka 2: Naměřená koncentrace kadmia (μM) ve vodných disperzích před a po expozici, pokles koncentrace kadmia po expozici v procentech, n představuje počet opakování měření

Testovaná látka	Nominální koncentrace kadmia před expozicí [μM]	Naměřená koncentrace kadmia před expozicí [μM]	Výtěžnost [%]	Naměřená koncentrace kadmia po expozici [μM]	Pokles koncentrace kadmia po expozici [%]
CdCl ₂ n=4	20,00	22,85 ± 0,00	114,25	3,84 ± 0,57	83,19
	200,00	227,30 ± 0,56	113,65	202,90 ± 7,51	10,73
CdTe QDs n=4	20,00	20,18 ± 0,09	100,90	11,99 ± 1,00	40,58
	200,00	192,40 ± 0,23	96,20	169,50 ± 4,73	11,90
CdTe/SiO ₂ QDs n=4	20,00	17,59 ± 0,10	87,95	10,42 ± 0,47	40,76
	200,00	169,10 ± 0,21	84,55	165,00 ± 2,99	2,42

5.2 Test toxicity se *S. alba*

Vyhodnocení makroskopického end-pointu (délka kořene) ukázalo, že mezi délkou kořene kontrolních rostlin a rostlin vystavených pozitivní kontrole nebo vodné disperzi QDs v obou testovaných koncentracích není statisticky významný rozdíl (na hladině významnosti 0,05). Délky kořenů, vypočtené jako průměr z deseti rostlin společně se směrodatnou odchylkou měření, jsou znázorněny na Obrázku 17. IC₅₀ pro *S. Alba* při expozici CdCl₂·5H₂O trvající po dobu tří dní je 547,36 μM [73]. Kadmium inhibuje růst kořene ve vyšších koncentracích, v námi zvoleném rozmezí koncentrací nebyla významná inhibice délky kořene očekávána [74].



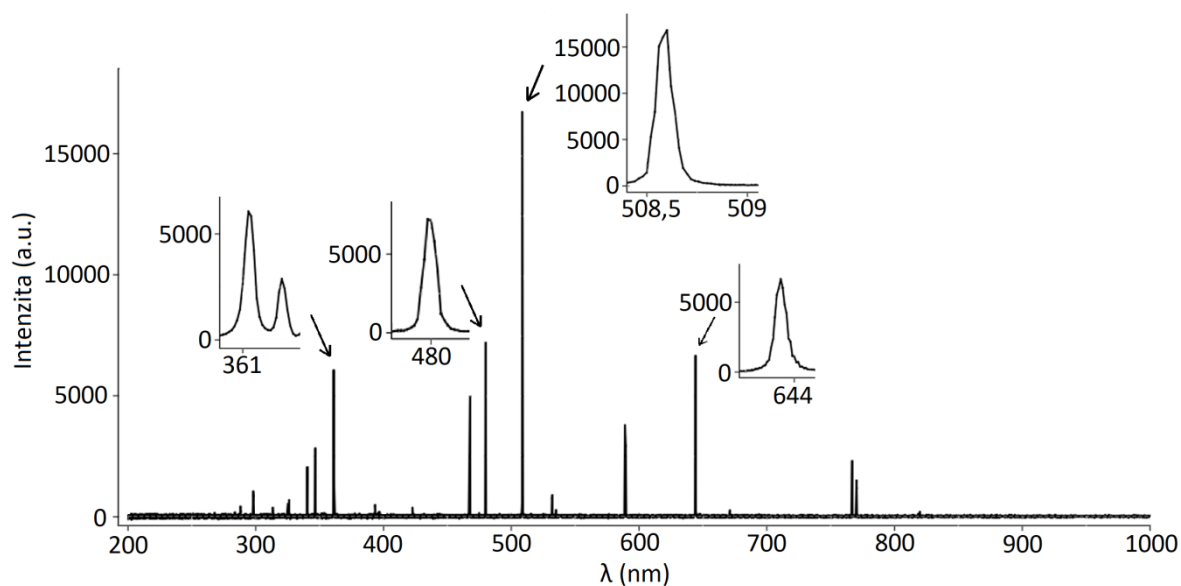
Obrázek 17: Průměrná délka kořene rostlin po 72 hodin trvající expozici rostlin *S. alba* ve vodných disperzích CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs a roztocích CdCl₂ o koncentracích 20 a 200 μM Cd

5.3 LIBS analýza

5.3.1 Optimalizace parametrů měření

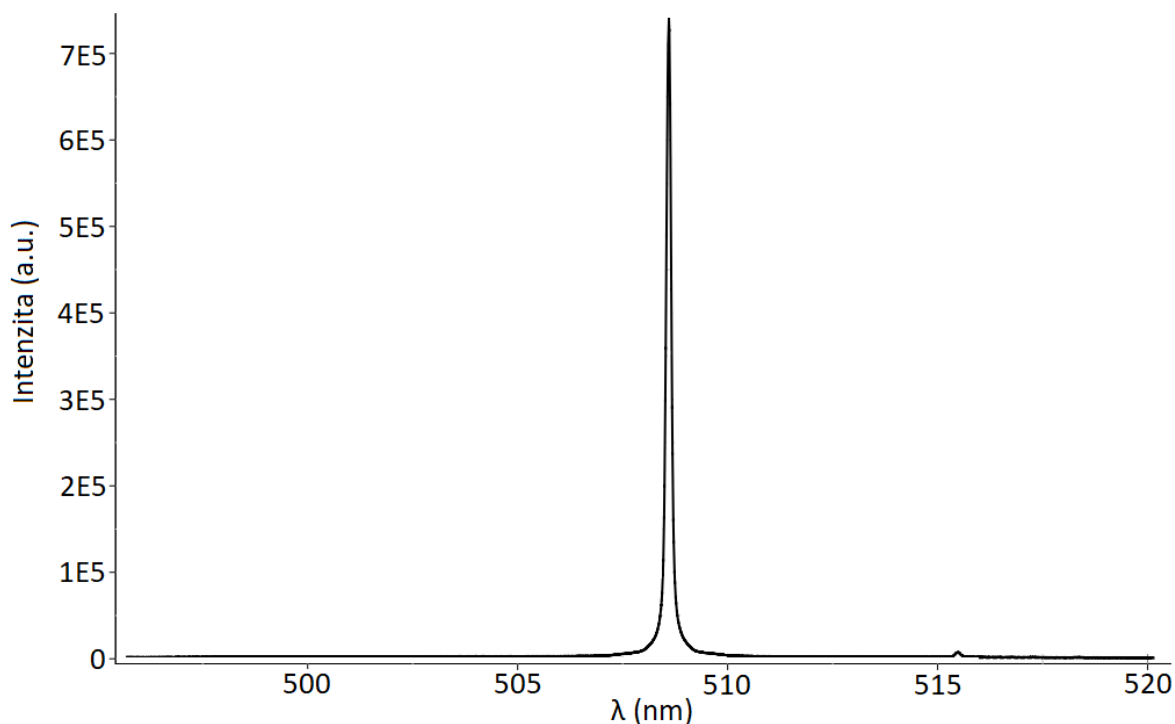
Výběr vhodné spektrální čáry kadmia a spektrometru

Z Obrázku 18, na kterém je vyobrazeno naměřené spektrum standardu kadmia a jsou přiblíženy významné spektrální čáry kadmia s nejvyšší naměřenou hodnotou intenzity, je patrné, že nejvyšší intenzity dosahuje spektrální čára o vlnové délce 508,56 nm s intenzitou přibližně 17 000 a.u.



Obrázek 18: Emisní spektrum standardu kadmia naměřené spektrometrem typu Echelle zaznamenané programem Kestrel, s přibližnými významnými spektrálními čarami, zleva: 361,25 nm, 361,29 nm, 479,99 nm, 508,56 nm a 643,85 nm

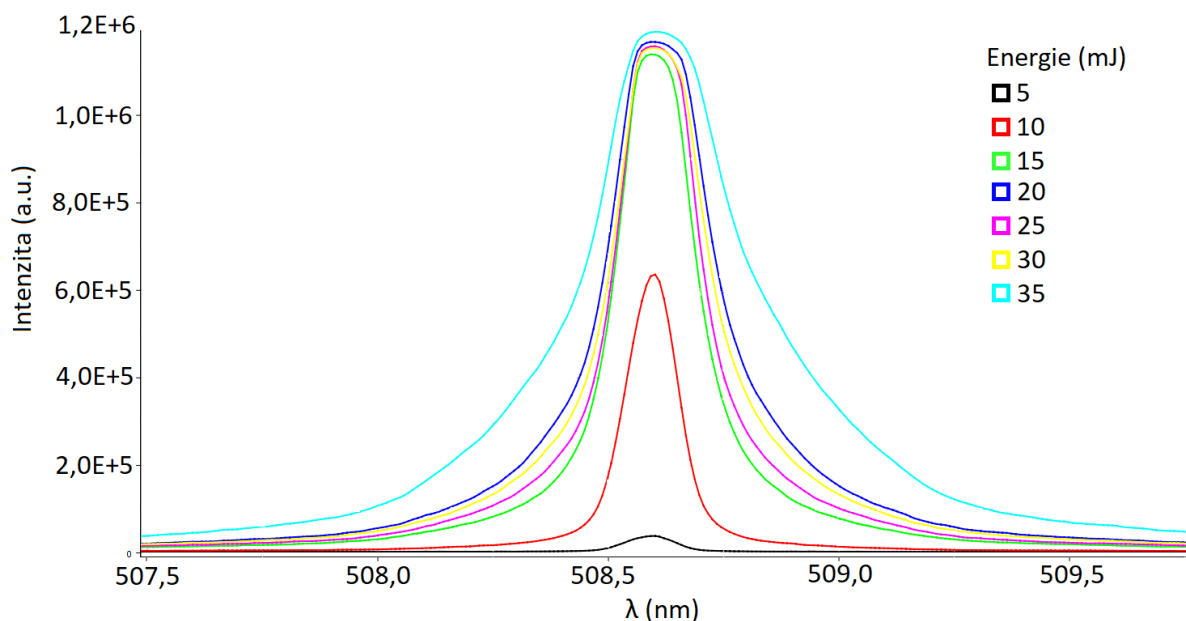
Spektrální čára o nejvyšší intenzitě byla následně detekována monochromátorem Czerny-Turner, na kterém, dle očekávání, dosáhla mnohonásobně vyšší intenzity téměř 750 000 a.u. Spektrum z monochromátoru typu Czerny-Turner je znázorněno na Obrázku 19. Tím byl potvrzen předpoklad vyšší citlivosti monochromátoru typu Czerny-Turner a všechna následující měření byla prováděna právě za jeho použití s nastavenou centrální vlnovou délkou 508 nm.



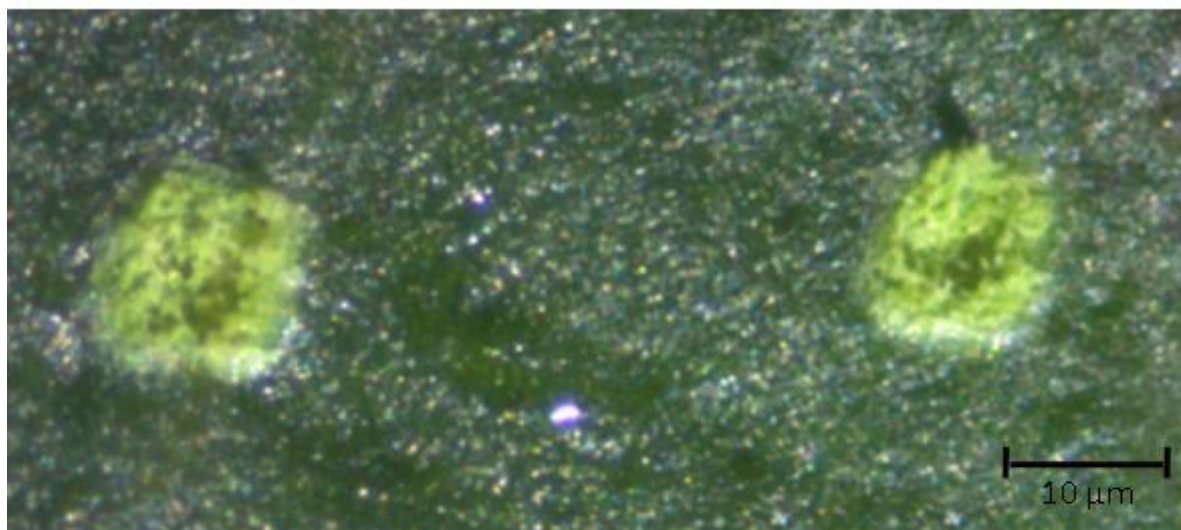
Obrázek 19: Emisní spektrum standardu kadmia naměřené monochromátorem Czerny-Turner zaznamenané programem Andor Solis s centrální vlnovou délkou 508 nm

Energie laseru

Jak je patrné z Obrázku 20, intenzita signálu při použití energie vyšší než 15 mJ dále výrazně nestoupá. Velikosti jednotlivých vzniklých kráterů se u vyšších energií lišily jen minimálně, na Obrázku 21 je vyobrazeno porovnání kráteru na rostlině *S. Alba* při použití energie 15 a 20 mJ, vlastnosti kráteru se při vyšší energii opět zhoršovaly. Jako energie laseru pro měření bylo zvoleno 20 mJ, protože bylo při této energii dosaženo vysokého signálu a současně hlubokého a přesně ohraničeného kráteru.



Obrázek 20: Vliv energie laseru na intenzitu signálu emisní čáry Cd I 508,58 nm



Obrázek 21: Mikroskopické snímky velikost kráterů na listu rostliny *S. Alba* při použití energie 15 mJ (vlevo) a 20 mJ (vpravo)

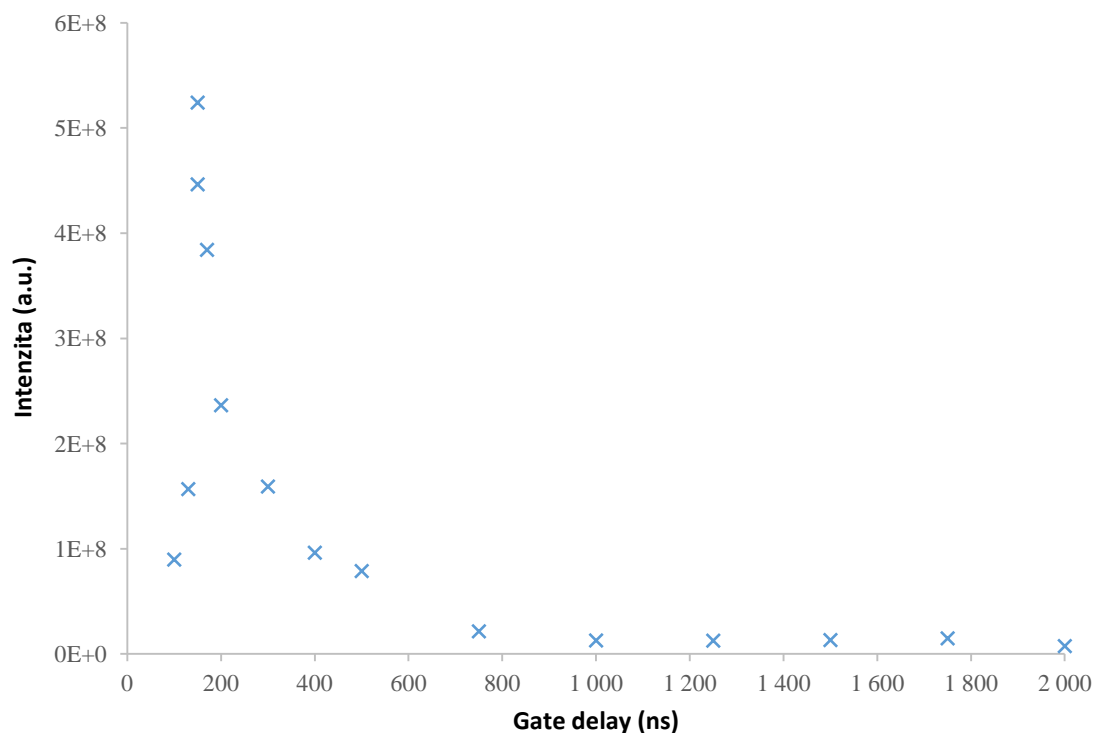
Rozteč

Jako vhodná rozteč pro mapování bylo zvoleno 100 μm ve směru osy x a y , vznikla tedy čtvercová síť. Vzhledem k časové náročnosti měření, dané velikostí reálných vzorků v řádu jednotek cm^2 , byl použit režim rychlého mapování (anglicky *fastmapping*), který umožňuje

mapování s frekvencí laserových pulzů 20 Hz, což je další faktor napomáhající zvýšené ablaci hmoty.

Čas měření po laserovém pulzu

Jak je patrné z Obrázku 22, nejvyššího akumulovaného signálu bylo dosaženo za použití nízkých hodnot GD, konkrétně nejlepší výsledky byly získány pro GD 150 ns, který byl proto vybrán pro další měření.



Obrázek 22: Graf závislosti signálu na čase měření po laserovém pulzu (ns)

Přehled optimalizovaných parametrů měření

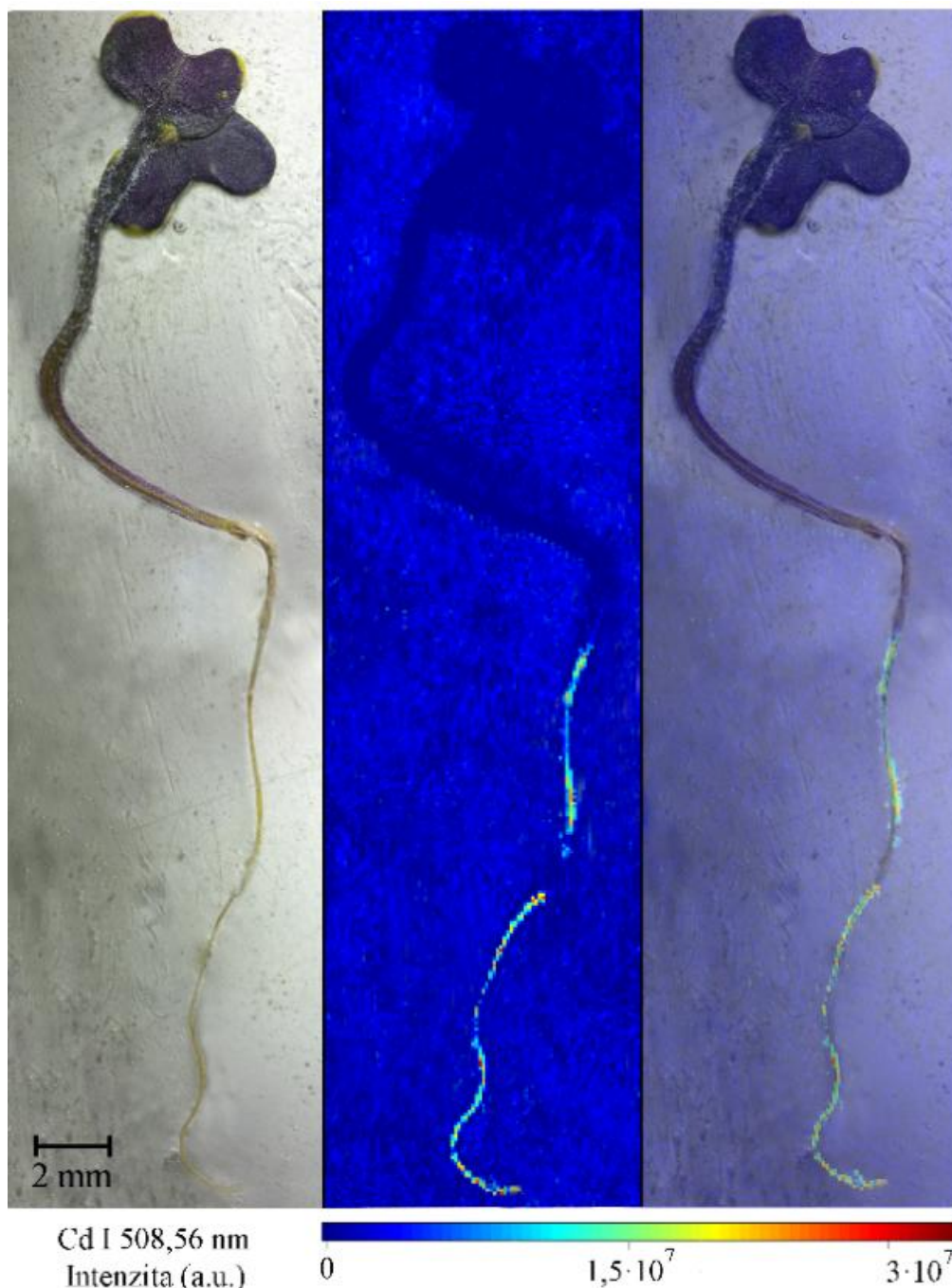
Spektrometr	Czerny-Turner
Spektrální čára	508,56 nm
Energie laseru	20 mJ
Rozteč mapy	100 μ m
Atmosféra	vzduch + ofuk a odtah
Čas měření po laserovém pulzu	150 ns
Integrační doba	50 μ s
Mód	rychlé mapování

5.3.2 Distribuce kadmia v rostlinách

Mapy plošné distribuce kadmia pro jednotlivé rostliny společně s mikroskopickým snímkem rostliny před samotnou laserovou ablací pro jednotlivé testované látky (CdTe QDs, CdTe/SiO₂ QDs, CdCl₂, H₂O) jsou znázorněny na Obrázcích 23 až 29.

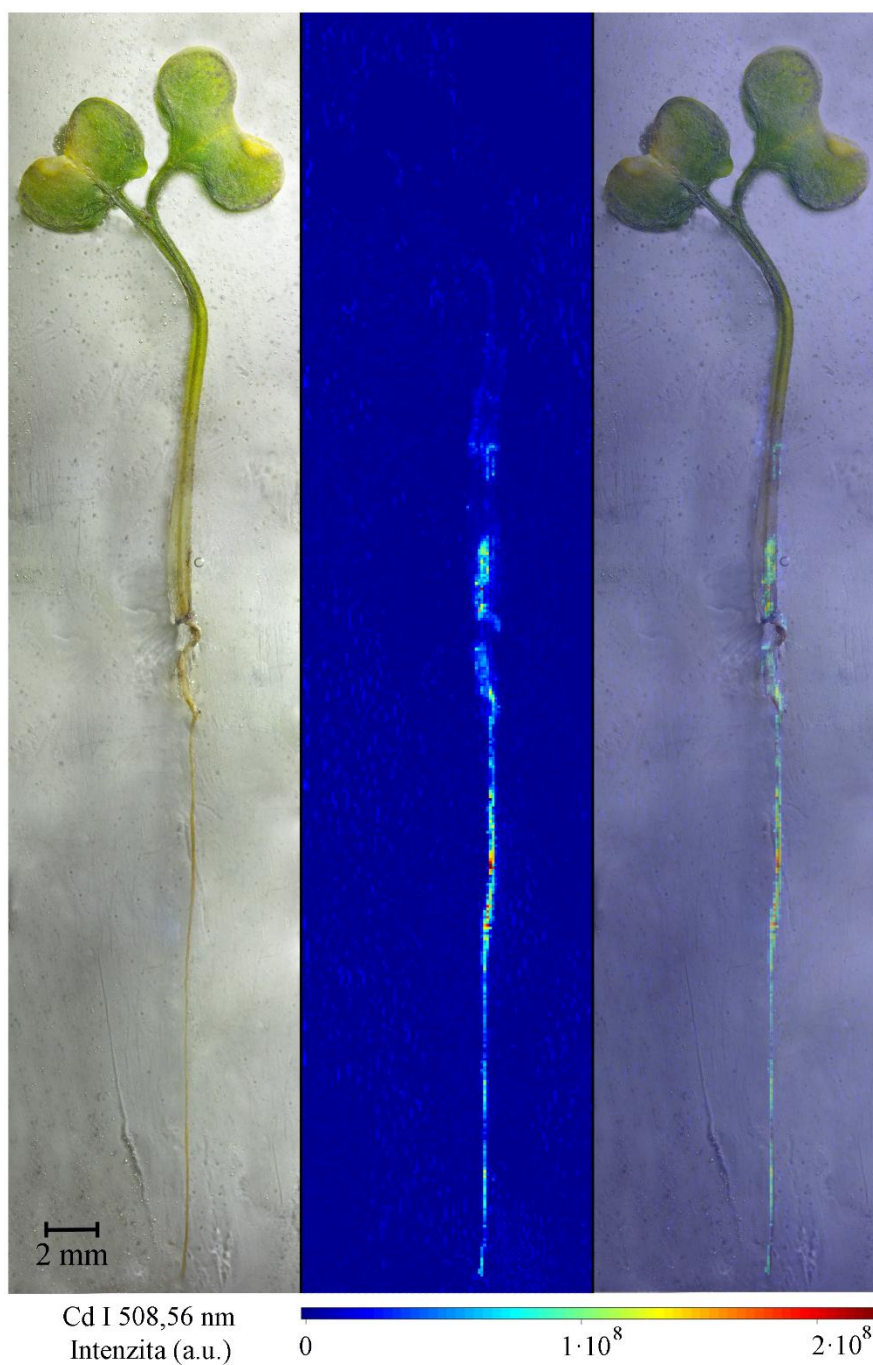
CdTe QDs

Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované ve vodné disperzi CdTe QDs o nominální koncentraci 20 μM Cd je znázorněna na Obrázku 23, počet naměřených spekter byl 399 \times 91.



Obrázek 23: Fotografie *S. Alba* po expozici ve vodné disperzi CdTe QDs o koncentraci 20 μM Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

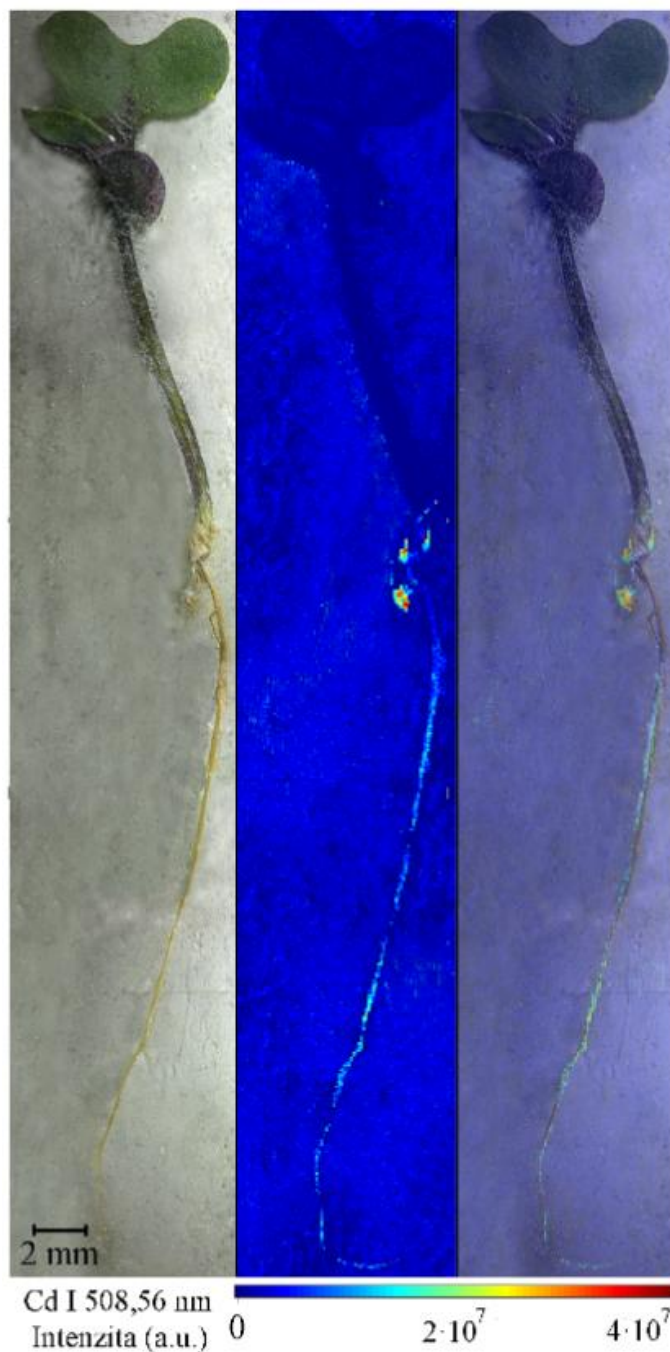
Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované ve vodné disperzi CdTe QDs o nominální koncentraci 200 μM Cd je znázorněna na Obrázku 24, počet naměřených spekter byl 469×104 .



Obrázek 24: Fotografie *S. Alba* po expozici ve vodné disperzi CdTe QDs o koncentraci 200 μM Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

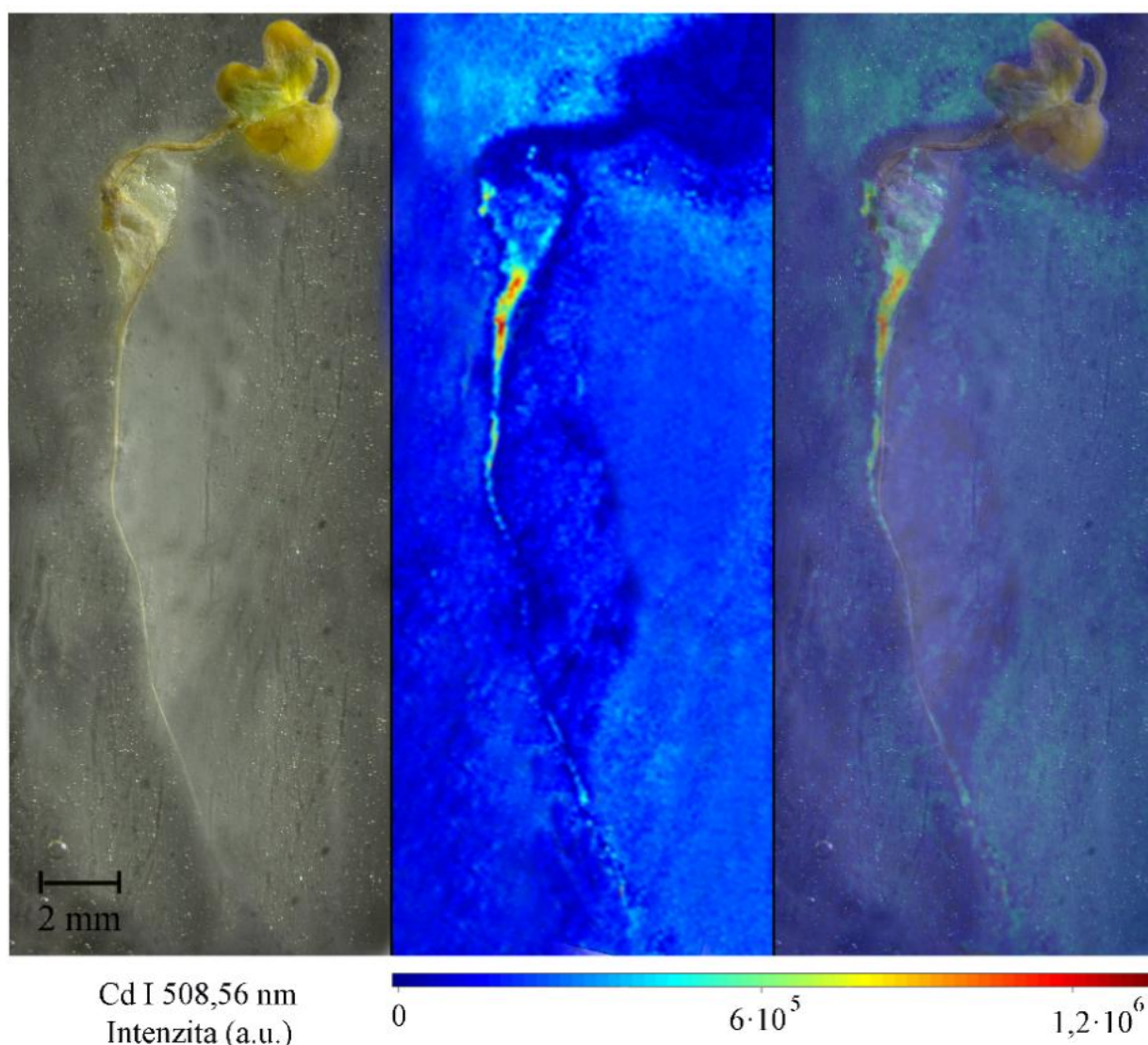
CdTe/SiO₂ QDs

Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované ve vodné disperzi CdTe/SiO₂ QDs o nominální koncentraci 20 µM Cd je znázorněna na Obrázku 25, počet naměřených spekter byl 527 × 90.



Obrázek 25: Fotografie *S. Alba* po expozici ve vodné disperzi CdTe/SiO₂ QDs o koncentraci 20 µM Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

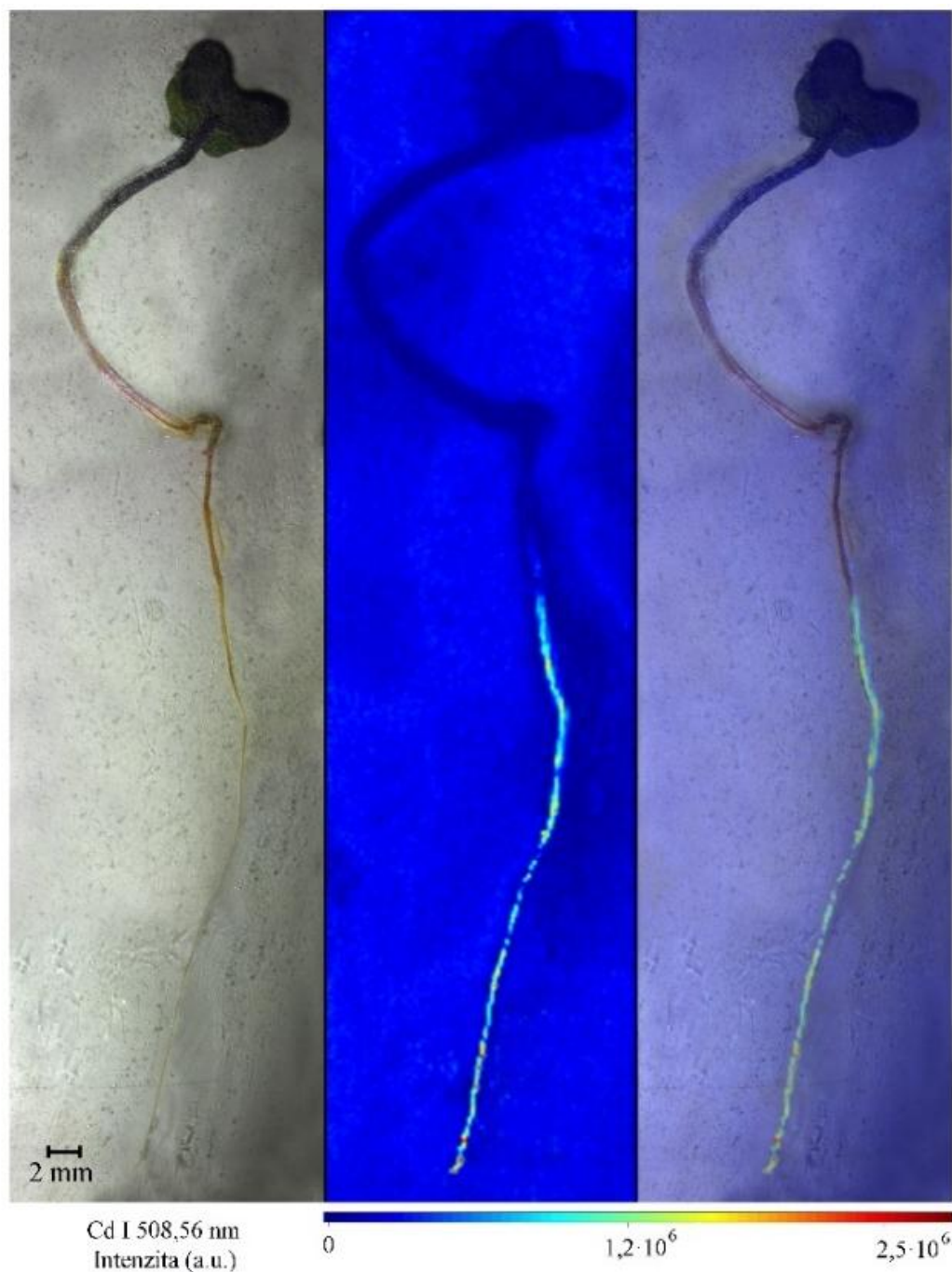
Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované ve vodné disperzi CdTe/SiO₂ QDs o nominální koncentraci 200 μ M Cd je znázorněna na Obrázku 26, počet naměřených spekter byl 309 \times 102.



Obrázek 26: Fotografie *S. Alba* po expozici ve vodné disperzi CdTe/SiO₂ QDs o koncentraci 200 μ M Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

Pozitivní kontrola – CdCl_2

Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované v roztoku CdCl_2 o nominální koncentraci $20\ \mu\text{M}$ Cd je znázorněna na Obrázku 27, počet naměřených spekter byl 466×103 .



Obrázek 27: Fotografie *S. Alba* po expozici v roztoku CdCl_2 o koncentraci $20\ \mu\text{M}$ Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

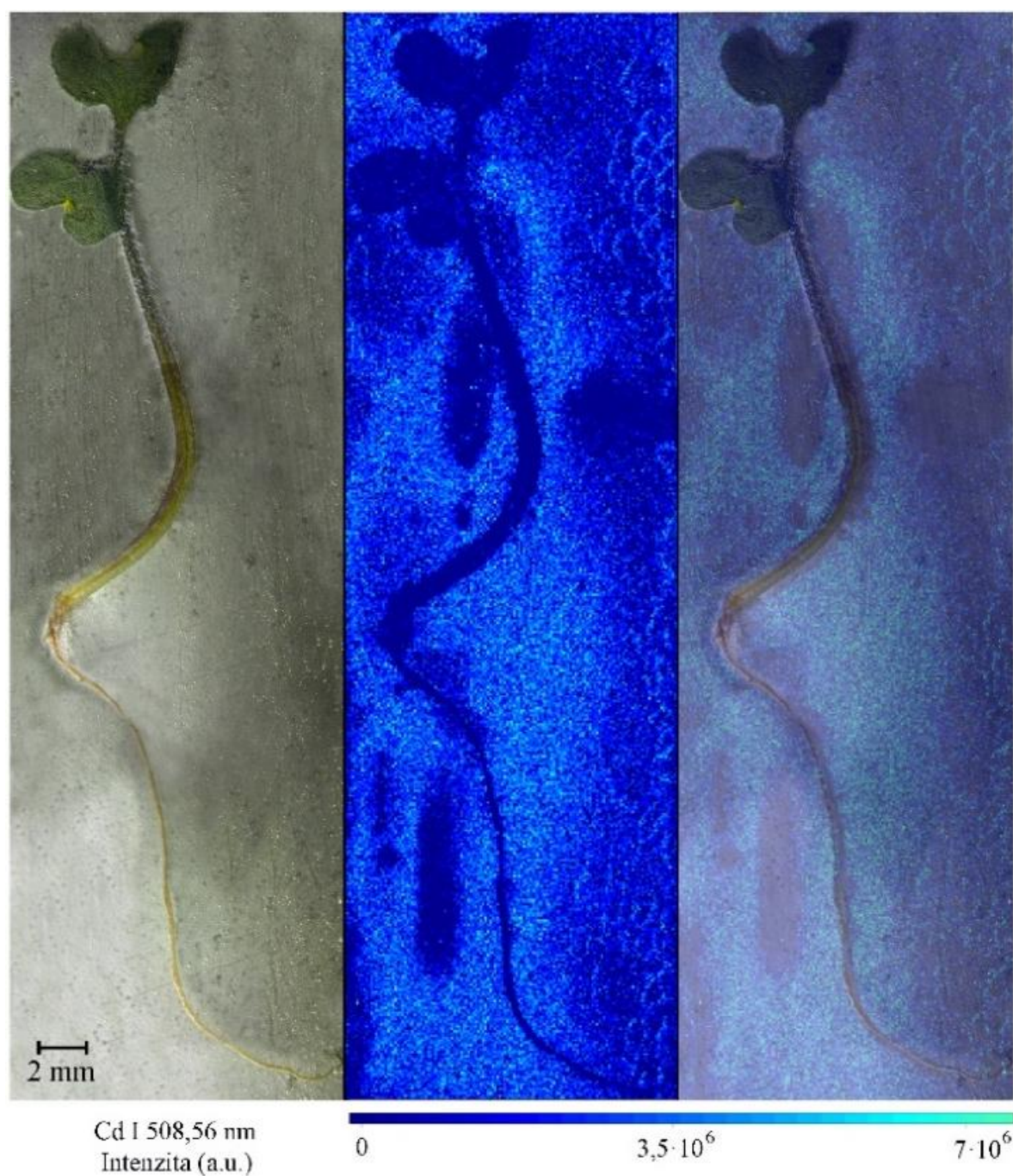
Mapa distribuce kadmia v rostlině *S. Alba* kultivované v roztoku CdCl_2 o nominální koncentraci $200 \mu\text{M}$ Cd je znázorněna na Obrázku 28, počet naměřených spekter byl 413×132 .



Obrázek 28: Fotografie *S. Alba* po expozici v roztoku CdCl_2 o koncentraci $200 \mu\text{M}$ Cd (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

Kontrola

Kontrolní měření provedené na rostlině *S. Alba* kultivované v destilované vodě je znázorněno na Obrázku 29, počet naměřených spekter byl 471×141 .



Obrázek 29: Fotografie *S. Alba* kultivované v destilované vodě (vlevo), LIBS mapa zkonstruovaná pro Cd 508,56 nm (uprostřed) a překryv LIBS mapy s fotografií rostliny (vpravo). Stupnice zobrazuje intenzitu vybrané emisní čáry.

Jak je patrné z výše uvedených map distribuce kadmia, nedochází k jeho účinné translokaci mezi podzemní a nadzemní částí rostliny, naprostá většina přijímaného kadmia, nehledě na jeho zdroj, zůstává lokalizována v kořenu testovací rostliny.

Na základě počtu spekter s detekovatelným signálem kadmia v každé mapě a na základě jejich intenzit je možné dojít k následujícím závěrům. U obou vodných disperzí kvantových teček (CdTe QDs i CdTe/SiO₂ QDs) se kadmium bioakumuluje výrazně méně než v rostlinách vystavených působení chloridu kademnatého. K nejvyšší bioakumulaci dochází tedy v následující posloupnosti: CdCl₂ (200 μM Cd), CdCl₂ (20 μM Cd), CdTe QDs (200 μM Cd), CdTe QDs (20 μM Cd), CdTe/SiO₂ QDs (200 μM Cd) a CdTe/SiO₂ QDs (20 μM Cd).

Tyto výsledky naznačují, že nedocházelo k bioakumulaci CdTe QDs do rostliny, ale pouze uvolněných volných iontů kadmia. Tato situace byla očekávána a je v souladu s nejnovější vědeckou literaturou. Modlitbová P. ve své studii za použití metod LIBS a TEM prokázala, že QDs nejsou přítomny v rostlinné tkáni a že nedochází k jejich adsorpci na povrch rostliny [5]. I ve své další práci poukázala Modlitbová P. pomocí fluorescenční mikroskopie na fakt, že nedochází k adsorpci CdTe QDs na povrch rostliny a dochází tedy k bioakumulaci iontů kadmia z jádra [75].

Protože CdTe/SiO₂ QDs jsou díky SiO₂ obalu stabilnější, nepředpokládá se uvolnění iontů kadmia do média v průběhu expozice, ale předpokládá se pouze jejich adsorpce na povrch rostliny. Tato zjištění korespondují s odbornou literaturou. Modlitbová P. ve své práci studovala CdTe/ZnS QDs s obdobnými výsledky, měřením na fluorescenčním mikroskopu se ukázala jejich adsorpce na povrch kořene, který byl jediným zdrojem kadmia v rostlině [2, 75].

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnocení toxicity a distribuce dvou druhů QDs (CdTe QDs a CdTe/SiO₂ QDs) a pozitivní kontroly CdCl₂ ve dvou koncentracích (200 µM Cd a 20 µM Cd) v modelové rostlině *S. Alba* metodou LIBS. Expozice testovacích rostlin probíhala po dobu 72 hodin, vysušené rostliny byly poté upevněny v epoxidové pryskyřici a byla stanovena prostorová distribuce kadmia metodou LIBS s rozlišením 100 µm.

Výsledky, podrobněji popsání v předešlé kapitole, prokázaly vyšší stabilitu CdTe/SiO₂ QDs. Z jejich jádra, díky přidanému obalu, neunikaly ionty kadmia, a docházelo pouze k jejich adsorpci na povrch rostliny. Naproti tomu z jádra CdTe QDs docházelo k uvolňování iontů kadmia, které následně byly přijímány testovací rostlinou. Použití vhodných obalů, jako například oxidu křemičitého, by tedy mohlo otevřít cestu širšímu využití QDs, například v biologickém zobrazování.

Experimenty rovněž prokázaly, že je metoda LIBS schopna spolehlivě a v dostatečném rozlišení zaznamenat distribuci kadmia v rostlinných vzorcích. Ačkoli jiné metody jsou schopny detekovat analyt s menším krokem měření, nejsou již schopny analyzovat vzorky o velikosti několika čtverečních centimetrů. Metoda LIBS je oproti těmto metodám časově, instrumentálně a finančně méně náročná a může sloužit jako screeningová metoda pro analýzu velkého množství vzorků. Zajímavá místa mohou být následně analyzována metodou LIBS s menším krokem (tzv. mikroLIBS), nebo může být využita jiná analytická metoda s lepším rozlišením. Je tedy pravděpodobné, že popularita metody LIBS jako alternativy pro detekci nanočástic v biologických materiálech v budoucnu i nadále poroste.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] XU, Ming, Guifu DENG, Shanshan LIU, Shuo CHEN, Dan CUI, Limin YANG a Qiuquan WANG. Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. *Metallomics* [online]. 2010, **2**(7), 469. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/c005387m
- [2] MODLITBOVÁ, Pavlína, Karel NOVOTNÝ, Pavel POŘÍZKA, Jakub KLUS, Přemysl LUBAL, Helena ZLÁMALOVÁ-GARGOŠOVÁ a Jozef KAISER. Comparative investigation of toxicity and bioaccumulation of Cd-based quantum dots and Cd salt in freshwater plant *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **147**(March 2017), 334–341. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2017.08.053
- [3] BERA, Debasis, Lei QIAN, Teng-Kuan TSENG a Paul H. HOLLOWAY. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials* [online]. 2010, **3**(4), 2260–2345. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma3042260
- [4] RZIGALINSKI, Beverly A. a Jeannine S. STROBL. Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, **238**(3), 280–288. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2009.04.010
- [5] RYVOLOVA, Marketa, Jana CHOMOUCKA, Jana DRBOHLAVOVA, Pavel KOPEL, Petr BABULA, David HYNEK, Vojtech ADAM, Tomas ECKSCHLAGER, Jaromir HUBALEK, Marie STIBOROVA, Jozef KAISER a Rene KIZEK. Modern Micro and Nanoparticle-Based Imaging Techniques. *Sensors* [online]. 2012, **12**(11), 14792–14820. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s121114792
- [6] DAVID, A. Cremers a J. Radziemski LEON. *History and Fundamentals of LIBS*. 2006. ISBN 9780511541261.
- [7] NOVOTNÝ, Karel, Jozef KAISER, Aleš HRDLÍČKA, Radomír MALINA, Tomáš VÉMOLA, David PROCHAZKA, Jan NOVOTNÝ a Viktor KANICKÝ. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). 2010, 280–285.
- [8] • *Atomová emisní spektrometrie* [online]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/6_FA_atomová_spektrometrie.pdf
- [9] MANGRICH, Antonio Sálvio. Editorial. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2007, **18**(3), 1–1. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532007000300001
- [10] SMITH, Benjamin W., Kay NIEMAX a Margaretha T.C. DE LOOS-VOLLEBREGT. Honorary issue for Nicoló Omenetto. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **100**, 1–2. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.08.030
- [11] CHLÁDOVÁ, Zuzana. How LIBS works. *Atomtrace*. 2018.
- [12] MOCEK, Tomáš. *LASER: supernástroj člověka 21. století* [online]. 2017. Dostupné z: <https://avcr.cz/cs/pro-verejnost/Laser-supernastroj-cloveka-21.-stoleti>
- [13] CHANG, Wiliam S.C. *Principles of Lasers and Optics*. B.m.: Cambridge University Press, 2005. ISBN 9780521642293.
- [14] Princip pevnoátkových Nd:YAG laserů 1064 nm Infra red. *Leonardo Technology* [online]. 2002. Dostupné z: <http://www.lt.cz/e-learning/laser/princip-pevnoatkovych-nd-yag-laseru-1064-nm-infra-red>
- [15] ELHASSAN, A., A. GIAKOUMAKI, D. ANGLOS, G.M. INGO, L. ROBBIOLOLA a M.A. HARITH. Nanosecond and femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopic analysis of bronze alloys. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(4), 504–511. ISSN 05848547. Dostupné

- z: doi:10.1016/j.sab.2008.02.003
- [16] NIČ, Miloslav, Jiří JIRÁT, Bedřich KOŠATA, Aubrey JENKINS a Alan MCNAUGHT, ed. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009. ISBN 0-9678550-9-8. Dostupné z: doi:10.1351/goldbook
- [17] MESTEK, Oto a Antonín KANA. *Atomová absorpční spektrometrie* [online]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [18] SONG, Kyuseok, Yong-Ill LEE a Joseph SNEDDON. Applications of Laser-Induced Breakdown Spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 1997, **32**(3), 183–235. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704929708003314
- [19] FORNARINI, L., V. SPIZZICHINO, F. COLAO, R. FANTONI a V. LAZIC. Influence of laser wavelength on LIBS diagnostics applied to the analysis of ancient bronzes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2006, **385**(2), 272–280. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-006-0300-1
- [20] GALIOVÁ, M., J. KAISER, K. NOVOTNÝ, J. NOVOTNÝ, T. VACULOVÍČ, M. LIŠKA, R. MALINA, K. STEJSKAL, V. ADAM a R. KIZEK. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Physics A* [online]. 2008, **93**(4), 917–922. ISSN 0947-8396. Dostupné z: doi:10.1007/s00339-008-4747-0
- [21] PASCHOTA, Rüdiger. Q Switching. *RP Photonics Encyclopedia* [online]. Dostupné z: https://www.rp-photonics.com/q_switching.html
- [22] BETTE, Holger, Reinhard NOLL, Gregor MÜLLER, Hans-Werner JANSEN, Çetin NAZIKKOL a Horst MITTELSTÄDT. High-speed scanning laser-induced breakdown spectroscopy at 1000 Hz with single pulse evaluation for the detection of inclusions in steel. *Journal of Laser Applications* [online]. 2005, **17**(3), 183–190. ISSN 1042-346X. Dostupné z: doi:10.2351/1.1961738
- [23] GLAUS, Reto a David W. HAHN. Double-pulse laser ablation coupled to laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **98**, 48–53. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.05.012
- [24] RASHID, Babar, Rizwan AHMED, Raheel ALI a M. A. BAIG. A comparative study of single and double pulse of laser induced breakdown spectroscopy of silver. *Physics of Plasmas* [online]. 2011, **18**(7), 073301. ISSN 1070-664X. Dostupné z: doi:10.1063/1.3599591
- [25] WHAT IS A MONOCHROMATOR? RESOLUTION VERSUS SENSITIVITY. *Analytical Solutions Australia* [online]. Dostupné z: https://www.analyticalsolns.com.au/applications/what_is_a_monochromator_resolution_versus_sensitivity.html
- [26] PALMER, Christopher A a Erwin G LOEWEN. *Diffraction Grating Handbook* [online]. 6th vyd. 2005. Dostupné z: [http://optics.sgu.ru/~ulianov/Students/Books/Applied_Optics/E.Loewen_Diffraction_Grating_Handbook_\(2005\).pdf](http://optics.sgu.ru/~ulianov/Students/Books/Applied_Optics/E.Loewen_Diffraction_Grating_Handbook_(2005).pdf)
- [27] PALMER, Christopher A a Erwin G LOEWEN. *Diffraction Grating Handbook - 6th Edition*. 6th editio. 2005.
- [28] Elements database. *Atomtrace* [online]. Dostupné z: <https://www.atomtrace.com/elements-database/>
- [29] FAROOQ, W. A., M. ATIF, W. TAWFIK, M. S. ALSALHI, Z. A. ALAHMED, M. SARFRAZ a J. P. SINGH. Study of Bacterial Samples Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Plasma Science and Technology* [online]. 2014, **16**(12), 1141–1146. ISSN 1009-0630. Dostupné z: doi:10.1088/1009-0630/16/12/10

- [30] KRAMIDA, A., Yu RALCHENKO a J. READER. NIST Atomic Spectra Database (version 5.5.1). *National Institute of Standards and Technology* [online]. 2017. Dostupné z: <https://physics.nist.gov/asd>
- [31] KURUCZ, R.L. a B. BELL. Atomic Line Data. *Atomic spectral line database from CD-ROM 23 of R. L. Kurucz*. [online]. 1995. Dostupné z: <https://www.cfa.harvard.edu/amp/ampdata/kurucz23/sekur.html>
- [32] NĚMEC, Michal. Interakce optického záření s látkou. *Úvod do laserové techniky KFE FJFI ČVUT Praha* [online]. 2014. Dostupné z: http://people.fjfi.cvut.cz/sulcjan1/ult/09_pevnolatkove_lasery.pdf
- [33] TOGNONI, Elisabetta, Anthony V. PALUMBO, Gabriele CRISTOFORETTI, Nicoló OMENETTO, Igor B. GORNUSHKIN a ET AL. *From Sample to signal in LIBS: a complex route to quantitative analysis*. 2006. ISBN 9780511541261.
- [34] AGUILERA, J. A., C. ARAGÓN a J. CAMPOS. Determination of Carbon Content in Steel Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online]. 1992, **46**(9), 1382–1387. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1366/0003702924123692
- [35] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **66**(4), 347–419. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1366/11-06574
- [36] JANTZI, Sarah C., Vincent MOTTO-ROS, Florian TRICHARD, Yuri MARKUSHIN, Nouredine MELIKECHI a Alessandro DE GIACOMO. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, **115**(January 2016), 52–63. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.11.002
- [37] RAUSCHENBACH, I., V. LAZIC, S.G. PAVLOV, H.-W. HÜBERS a E.K. JESSBERGER. Laser induced breakdown spectroscopy on soils and rocks: Influence of the sample temperature, moisture and roughness. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(10), 1205–1215. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2008.08.006
- [38] MOON, Youngmin, Jung Hyun HAN, Jong Jin LEE a Sungho JEONG. Influence of water content on the laser-induced breakdown spectroscopy analysis of human cell pellet. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2015, **114**, 27–33. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.09.020
- [39] CREMERS, David A. a Rosemarie C. CHINNI. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2009, **44**(6), 457–506. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920903058755
- [40] OVERTON, Gail. LIBS spectrometer from LANL to seek life on Mars. *LaserFocusWorld* [online]. 2011. Dostupné z: <https://www.laserfocusworld.com/articles/2011/11/libl-lanl-mars-life.html>
- [41] DA SILVA GOMES, Marcos, Gabriel Gustinelli Arantes DE CARVALHO, Dário SANTOS a Francisco José KRUG. A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2013, **86**, 137–141. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2013.03.009
- [42] SANCEY, L., V. MOTTO-ROS, B. BUSSER, S. KOTB, J. M. BENOIT, A. PIEDNOIR, F. LUX, O. TILLEMENT, G. PANCZER a J. YU. Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. *Scientific Reports* [online]. 2015, **4**(1), 6065. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep06065

- [43] GIMENEZ, Y., B. BUSSE, F. TRICHARD, A. KULESZA, J. M. LAURENT, V. ZAUN, F. LUX, J. M. BENOIT, G. PANCZER, P. DUGOURD, O. TILLEMENT, F. PELASCINI, L. SANCEY a V. MOTTO-ROS. 3D Imaging of Nanoparticle Distribution in Biological Tissue by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 29936. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep29936
- [44] KRAJCAROVÁ, L., K. NOVOTNÝ, M. KUMMEROVÁ, J. DUBOVÁ, V. GLOSER a J. KAISER. Mapping of the spatial distribution of silver nanoparticles in root tissues of *Vicia faba* by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Talanta* [online]. 2017, **173**(January), 28–35. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.05.055
- [45] MOHAMMED, Faraz, F MOHAMMED, T F ARISHIYA a S Mohamed MICROTOMES. Microtomes and Microtome Knives – A Review and Proposed Classification. *Annals of Dentistry*. 2012, **19**(2), 43–50.
- [46] BHUSHAN, Bharat. *Springer handbook of nanotechnology*. B.m.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004. ISBN 3-540-01218-4.
- [47] DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické Listy*. 2015, **109**(6), 444–450. ISSN 12137103.
- [48] ISO/TS 80004-4:: Nanotechnologies --Vocabulary -- Part 4: Nanostructured materials. *International Organization for Standardisation*.
- [49] SOVOVÁ, T. a V. KOČÍ. Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické Listy*. 2012, **106**(2), 82–87. ISSN 00092770.
- [50] ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* [online]. 1996, **271**(5251), 933–937. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.271.5251.933
- [51] JELINEK, Raz. *2 Semiconductor nanoparticles*. 2015. ISBN 978-3-11-033002-1.
- [52] JELINEK, Raz. Nanoparticles. 2015, 1–6.
- [53] VANÍČKOVÁ, Markéta, Jana SOUKUPOVÁ a Libor KVÍTEK. Nanotechnologie ve výuce přírodních věd. *Chemické Listy*. 2010, **104**(10), 945–949. ISSN 00092770.
- [54] PERRAULT, Steven David. Gold Nanoparticles for Efficient Tumour Targeting : Materials , Biology & Application. 2010, (March), 163.
- [55] HARDMAN, Ron. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2006, **114**(2), 165–172. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.8284
- [56] FONTES, Adriana a John M WALKER. *Quantum Dots: Applications in Biology* [online]. 2014. ISBN 978-1-4939-1279-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1280-3
- [57] HOFFMAN, David J., Barnett A. RATTNER, G. Allen Jr. BURTON a John Jr. CAIRNS. *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition* [online]. 2nd vyd. B.m.: Lewis Publishers, 2002. ISBN 1-56670-546-0. Dostupné z: <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6U3MBQAAQBAJ&pgis=1>
- [58] NEWMAN, Martin C. *Fundamentals of ecotoxicology* [online]. 4th vyd. B.m.: CRC press, 2015. ISBN 9781466582323. Dostupné z: <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>
- [59] MARŠÁLEK, Blahoslav. *Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití*
- [60] ANDEL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. 1st vyd. Liberec: Evernia s.r.o., 2011. ISBN 97-80-903787-9-7.
- [61] CHAMBERS, F.L. *A textbook of modern toxicology* [online]. 3rd vyd. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN 9780470462065. Dostupné z: doi:10.1016/0165-6147(87)90110-6
- [62] LEHMAN, Christine. Definition of Toxic Endpoint. *Sciencing* [online]. 2017. Dostupné z: <https://sciencing.com/definition-toxic-endpoint-6603458.html>

- [63] MOISEENKO, T. I. Aquatic ecotoxicology: Theoretical principles and practical application. *Water Resources* [online]. 2008, **35**(5), 530–541. ISSN 0097-8078. Dostupné z: doi:10.1134/S0097807808050047
- [64] BURSÍK, Martin. *Technická směrnice Hydraulické kapaliny*. B.m.: Ministerstvo životního prostředí. 2009
- [65] CAI, Yong a Lena Q. MA. Metal Tolerance, Accumulation, and Detoxification in Plants with Emphasis on Arsenic in Terrestrial Plants. In: *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements* [online]. 2009, s. 95–114. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2003-0835.ch008
- [66] WANG, Jing, Yu YANG, Huiguang ZHU, Janet BRAAM, Jerald L. SCHNOOR a Pedro J.J. ALVAREZ. Uptake, translocation, and transformation of quantum dots with cationic versus anionic coatings by *Populus deltoides* × *nigra* cuttings. *Environmental Science and Technology* [online]. 2014, **48**(12), 6754–6762. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/es501425r
- [67] KOO, Yeonjong, Jing WANG, Qingbo ZHANG, Huiguang ZHU, E. Wassim CHEHAB, Vicki L. COLVIN, Pedro J. J. ALVAREZ a Janet BRAAM. Fluorescence Reports Intact Quantum Dot Uptake into Roots and Translocation to Leaves of *Arabidopsis thaliana* and Subsequent Ingestion by Insect Herbivores. *Environmental Science & Technology* [online]. 2015, **49**(1), 626–632. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es5050562
- [68] KAISER, J., M. GALIOVÁ, K. NOVOTNÝ, R. ČERVENKA, L. REALE, J. NOVOTNÝ, M. LIŠKA, O. SAMEK, V. KANICKÝ, A. HRDLIČKA, K. STEJSKAL, V. ADAM a R. KIZEK. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2009, **64**(1), 67–73. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2008.10.040
- [69] KAISER, Jozef, Karel NOVOTNÝ, Madhavi Z. MARTIN, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Martin HARTL, Vojtěch ADAM a René KIZEK. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. *Surface Science Reports* [online]. 2012, **67**(11–12), 233–243. ISSN 01675729. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfrep.2012.09.001
- [70] JOLIVET, L., M. LEPRINCE, S. MONCAYO, L. SORBIER, C.-P. LIENEMANN a V. MOTTO-ROS. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **151**(November 2018), 41–53. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.11.008
- [71] KAISER, J., O. SAMEK, L. REALE, M. LIŠKA, R. MALINA, A. RITUCCI, A. POMA, A. TUCCI, F. FLORA, A. LAI, L. MANCINI, G. TROMBA, F. ZANINI, A. FAENOV, T. PIKUZ a G. CINQUE. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2007, **70**(2), 147–153. ISSN 1059910X. Dostupné z: doi:10.1002/jemt.20394
- [72] MODLITBOVÁ, Pavlína, Antonín HLAVÁČEK, Tereza ŠVESTKOVÁ, Pavel POŘÍZKA, Lucie ŠIMONÍKOVÁ, Karel NOVOTNÝ a Jozef KAISER. The effects of photon-upconversion nanoparticles on the growth of radish and duckweed: Bioaccumulation, imaging, and spectroscopic studies. *Chemosphere* [online]. 2019, **225**, 723–734. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.074
- [73] MOLNÁROVÁ, Marianna, Monika ŠMELKOVÁ a Agáta FARGAŠOVÁ. Assessment of the suitability of phytotoxkit plastic vertical containers compared with

- petri dishes for standard seedling growth tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2014, **92**(4), 497–501. ISSN 14320800. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-013-1186-1
- [74] SEREGIN, I V a V B IVANOV. Histochemical Investigation of Cadmium. 2017, (November 1997). ISSN 09507035 (ISSN).
- [75] MODLITBOVÁ, Pavlína, Pavel POŘÍZKA, Karel NOVOTNÝ, Jana DRBOHLAVOVÁ, Ivana CHAMRADOVÁ, Zdeněk FARKA, Helena ZLÁMALOVÁ-GARGOŠOVÁ, Tea ROMIH a Jozef KAISER. Short-term assessment of cadmium toxicity and uptake from different types of Cd-based Quantum Dots in the model plant *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **153**(August 2017), 23–31. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2018.01.044

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

QDs	kvantové tečky, quantum dots
LIBS	spektroskopie laserem buzeného plazmatu, laser-induced breakdown spectroscopy
OES	optické emisní metody, optical emission spectroscopy
LIPS	laser-induced plasma spectroscopy
AAS	atomová absorpční spektroskopie, atomic absorption spectroscopy
ICP-OES	optická emisní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
LA-ICP-MS	laserová ablace s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu, laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy
LA-ICP-OES	laserová ablace s optickou emisní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu, laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
PMT	fotonásobiče, photomultipliers
PD	fotodiody, photodiodes
PDA	detektory diodového pole, photodiode detector
CCD	zařízení s řízenými náboji, charged-coupled device
MCP	mikrokanálové desky
ICCD	intenzifikované zařízení s řízenými náboji
GD	čas měření po laserovém luzu, gate delay
GW	integrační doba, gate width
NIST	National institute of standards and technology
NPs	nanočástice, nanoparticles
LC	letální koncentrace, lethal concentration
EC	efektivní koncentrace, effective concentration
IC	inhibiční koncentrace, inhibitory concentration
CAS	registrační číslo, chemical abstrakt service
AgNPs	stříbrné nanočástice, silver nanoparticles
MPA	merkaptopropionová kyselina, mercaptopropionic acid
TEM	transmisní elektronová mikroskopie, transmission electron microscopy
UCNPs	foton up-konverzní nanočástice, photon up-conversion nanoparticles
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie, scanning electron microscopy
DLS	dynamický rozptyl světla, dynamic light scattering